

**Photoinduzierte Degradation pharmazeutisch  
relevanter Substanzen in Wässern - Kinetische,  
strukturchemische und ökotoxikologische  
Untersuchungen von Wirkstoffen und deren  
Abbauprodukten unter Anwendung von  
Advanced Oxidation Processes**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

**Melanie Voigt**

geboren in Velbert

**Institut Physikalische Chemie - Fakultät Chemie**

der

Universität Duisburg-Essen

**2017**

Die vorliegende Arbeit wurde als kooperative Promotion im Zeitraum von Januar 2014 bis Mai 2017 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Martin Jäger im Fachbereich Chemie der Hochschule Niederrhein mit Herrn Prof. Dr. Christian Mayer, Institut für Physikalische Chemie der Universität Duisburg-Essen, durchgeführt.

Tag der Disputation: 02. August 2017

Gutachter:	Prof. Dr. Christian Mayer
	Prof. Dr. Martin Jäger
Vorsitzender:	Prof. Dr. Thomas Schrader

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung und Ziele.....	4
1.1    Verbreitung von Pharmazeutika in der Umwelt .....	4
1.2    Ziele und Aufgabenstellung.....	5
2. Theoretische Grundlagen.....	9
2.1    Weltweite Verbreitung Pharmazeutika .....	9
2.2    Auswahl der Antibiotika für diese Studie .....	11
2.2.1    Fluorchinolone.....	11
2.2.2    Makrolide .....	14
2.2.3    Sulfonamide.....	17
2.2.4    Tetracycline .....	19
2.3    Advanced Oxidation Processes (AOPs) .....	21
2.3.1    Photolyse induziert durch UVA- und UVC-Bestrahlung.....	22
2.3.2    Anwesenheit von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	24
2.3.3    TiO <sub>2</sub> als heterogener Katalysator.....	25
2.3.4    Nachweis von OH-Radikalen mittels ESR-Spektroskopie.....	27
2.4    Kinetik der Photodegradation .....	28
2.5    Anwendung der multivariater Datenanalyse.....	33
2.6    Verwendete Organismen für ökotoxikologische Untersuchungen .....	35
3 Experimentelle Grundlagen .....	38
3.1    Chemikalien .....	38
3.2    Analyse von Gewässerproben.....	39
3.2.1    SPE-Methode für die Gewässerproben .....	40
3.2.2    HPLC-ESI-MS Untersuchungen der Wasserproben .....	41
3.3    Nachweis und Identifizierung der Pharmazeutika in Modellwässern.....	42
3.3.1    Nachweismethode unter Verwendung eines HPLC-ESI-Q-TOF-MS.....	42
3.3.2    Nachweismethode unter Verwendung eines HPLC-ESI-IT-MS.....	43
3.3.3    Bestimmung der Absorbanz mittels UV/Vis-Spektroskopie.....	44

3.4	Photoinduzierte Abbauversuche .....	44
3.4.1	Aufbau der Versuchsanordnung .....	44
3.4.2	Einsatz photokatalytischer Substanzen.....	45
3.4.3	Einfluss von Sauerstoff.....	46
3.4.4	Photodegradationsversuche mit Wasserproben aus dem Kläranlagenablauf ..	46
3.4.5	Charakteristika der verwendeten UV-Lampen .....	47
3.5	Kinetik-Fit der Photodegradationsversuche.....	50
3.6	Bestimmung der MHK.....	50
3.7	Multivariate Datenanalyse .....	51
4	Ergebnisse und Diskussion .....	52
4.1	Analyse von Gewässerproben.....	52
4.2	Allgemeine Versuche zur Photodegradation .....	56
4.2.1	Zusammensetzung der untersuchten Makrolidantibiotika.....	57
4.2.2	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten mittels UV/Vis-Spektroskopie ....	58
4.2.3	Beschreibung der Kinetik unter Verwendung des Curve-Fitting Tool.....	61
4.2.4	Dunkelversuch als Kontrollversuch .....	62
4.2.5	Bestimmung der MHKs.....	63
4.3	Fluorchinolone .....	67
4.3.1	Photoinduzierte Abbauversuche und ökotoxikologische Untersuchungen der Abbauversuche .....	68
4.3.2	Visualisierung der Einflussfaktoren auf die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten .....	74
4.3.3	Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten bei UVA- und UVC-Bestrahlung....	79
4.3.4	Identifizierung neuer Photodegradanten.....	81
4.3.5	Photodegradanten von Enoxacin, Levofloxacin und Lomefloxacin während UVA- und UVC-Bestrahlung .....	83
4.3.6	Vergleich der Photodegradationsversuche zwischen MilliQ-Wasser und Kläranlagenablauf .....	88
4.3.7	Beurteilung der möglichen photoinduzierten Ökotoxizität .....	89
4.4	Makrolide.....	92
4.4.1	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Photoreaktionen von Makroliden .....	93
4.4.2	Analyse der identifizierten Photodegradanten.....	96

4.4.3	Einfluss von gelöstem Sauerstoff am Beispiel von Spiramycin.....	103
4.4.4	Vergleich der durch UVA- und UVC-Bestrahlung induzierten Photodegradation der Makrolide .....	105
4.4.5	Einfluss von TiO <sub>2</sub> auf den Azithromycin-Abbau unter UVA-Bestrahlung...	107
4.4.6	Beurteilung der Ökotoxizität mittels QSAR.....	108
4.5	Sulfonamide .....	110
4.5.1	Kinetik der Photodegradation der Sulfonamide .....	112
4.5.2	Besonderheit bei der Photoproduktentstehung von Sulfamethoxazol.....	115
4.5.3	Photodegradationsprodukte von Sulfamethazin und Sulfadiazin.....	120
4.5.4	Ökotoxizitätseinschätzung.....	125
4.6	Tetracycline .....	127
4.6.1	Degradation von Tetracyclinen durch UVC-Bestrahlung .....	128
4.6.2	Effektivität des photoinduzierten Abbaus in Anwesenheit von TiO <sub>2</sub> .....	128
4.7	Vergleich der Vertreter der 4 untersuchten Antibiotikaklassen.....	131
4.8	Eliminierung von Pharmazeutika aus Wasserproben .....	134
	Zusammenfassung und Ausblick .....	138
	Conclusion.....	141
	Literaturverzeichnis.....	143
	Anhang .....	163
	Anhang A Fluorchinolone .....	163
	Abkürzungsverzeichnis .....	168
	Publikationsliste .....	169
	Lebenslauf .....	171
	Danksagung .....	173
	Eidesstattliche Erklärung.....	174

## 1. Einleitung und Ziele

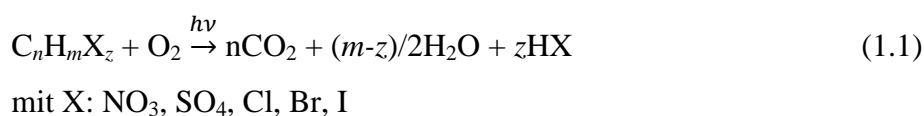
### 1.1 Verbreitung von Pharmazeutika in der Umwelt

Das Vorkommen von Pharmazeutika in Gewässern ist für die Umwelt ein großes Problem<sup>1-5</sup>. Es kommt zur Verweiblichung von Fischen oder zur Bildung von resistenten Bakterien<sup>6-11</sup>. Die Weltgesundheitsbehörde WHO warnte im Jahr 2014 vor antibiotikaresistenten Bakterien, die weltweit gefunden worden sind<sup>12</sup>. Jährlich sterben in der EU 25 000 Menschen an den Folgen von resistenten Bakterien und weltweit könnte es sich um 700 000 Menschen handeln<sup>13</sup>.

Neue Entwicklungen in der Analytik ermöglichen den Nachweis von Pharmazeutika in Konzentrationen von µg- bis ng-Bereichen und es werden immer wieder neue Studien über das Vorkommen vieler Pharmazeutika in Gewässern veröffentlicht. Zur Beseitigung dieses Problems wurden zunächst die Ursachen ermittelt. Pharmazeutika gelangen durch unsachgemäße Entsorgung in den Wasserkreislauf. Weitere Eintragsquellen sind Klinik- und industrielle Abwässer von Pharmaunternehmen. In Klinikabwässer konnte eine erhöhte Anzahl an Pharmazeutika gefunden werden<sup>14-16</sup>. Auch stehen Pharmaunternehmen unter Verdacht erhöhte Konzentration von Wirkstoffen in die Gewässer einzuleiten. Diese Vermutung wurde bereits durch Studien bestätigt<sup>17,18</sup>. In Wasserproben, die in der Nähe von Pharmaunternehmen aus Gewässern entnommen wurden, konnte eine erhöhte Anzahl an antibiotikaresistente Bakterien beobachtet werden<sup>19,20</sup>. Die mit Pharmazeutika kontaminierten Abwässer gelangen direkt zur Kläranlage. Herkömmliche Kläranlagen, die mit mechanischen, biologischen und chemischen Reinigungsstufen ausgestattet sind, sind oftmals nicht mehr in der Lage diese Substanzen aus dem Gewässer vollständig zu entfernen<sup>21</sup>. Das liegt vor allem daran, dass in der biologischen Reinigungsstufe die Bakterien diese Antibiotika nicht mehr abbauen können. Die Antibiotika sind resistent gegen die Bakterien<sup>22-26</sup>. Ein weiterer Effekt, der beobachtet wurde, ist die Aufkonzentrierung einiger Pharmazeutika in Kläranlagen<sup>27</sup>.

In den letzten Jahrzehnten wurde deshalb die Forschung an einer vierten Reinigungsstufe zur Eliminierung der Pharmazeutika intensiviert. Eine vielversprechende Möglichkeit zur

Eliminierung dieser Wirkstoffe ist die Anwendung von sogenannten Advanced Oxidation Processes (AOPs)<sup>28–33</sup>. Zu diesen gehört beispielsweise die Bestrahlung der gelösten Substanzen mit UV-Licht, die mit Zugabe von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder Titandioxid (TiO<sub>2</sub>) durchgeführt werden kann, wobei die Eliminierung beschleunigt wird<sup>34–38</sup>. Weitere AOPs sind zum Beispiel Ozonierung, photoelektrokatalytische Reaktion oder Photo-Fenton-Prozesse<sup>28,30,39</sup>. Im Idealfall tritt eine vollständige Mineralisierung der organischen Substanzen nach Gleichung 1.1 auf, was die Toxizität verringert bzw. zu beseitigt<sup>28,40–42</sup>.



Der Nachteil der Anwendung von AOPs ist, dass zum Beispiel bei UV-Bestrahlung noch toxischere Produkte entstehen können als deren Ausgangssubstanz<sup>43,44</sup>. Somit ist es wichtig, die Bestrahlung so lange durchzuführen, bis die vollständige Mineralisierung des Pharmazeutikums erreicht worden ist.

Die Anwendung von UV-Bestrahlung zur Eliminierung von Antibiotika steht in dieser Arbeit im Fokus. Dabei werden strukturelle, kinetische und ökotoxikologische Untersuchungen bei der photoinduzierten Degradation von Antibiotika vorgenommen.

## 1.2 Ziele und Aufgabenstellung

Zunächst werden Wasserproben aus dem Klärwerk in Krefeld (EGK Entsorgungsgesellschaft Krefeld GmbH & Co. KG) und Proben aus einem Bach, in den Kläranlagenabwasser eingeleitet wird, entnommen und auf Anwesenheit von Pharmazeutika untersucht. Fokus ist hierbei eine Methode für die Wasseruntersuchungen der Proben zu entwickeln und heimische Wässer auf Anwesenheit von Pharmazeutika zu analysieren.

Hinsichtlich der Eliminierung von Pharmazeutika mittels UV-Bestrahlung werden vier Antibiotikaklassen untersucht: Fluorchinolone, Makrolide, Sulfonamide und Tetracycline. Hierbei werden systematisch Versuche in einem 1L Batch Reaktor

durchgeführt. Zur Verfügung stehen zwei verschiedene UV Lampen; eine Mitteldruck Quecksilber Lampe, die vorwiegend diskrete Strahlung im UVA- Bereich bei 313 nm und 365 nm emittiert und eine Niederdruck Quecksilber Lampe, die ihre Hauptemission bei 254 nm und somit im UVC-Bereich besitzt. Darüber hinaus emittiert diese Lampe VUV-Strahlung, d.h. Strahlung unterhalb von 200 nm, die indirekt mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden kann. Zu den Versuchsbedingungen wird der pH-Wert variiert um verschiedene pH-Bedingungen in Kläranlagen zu simulieren. Des Weiteren wird mit zwei Katalysatoren mit systematisch variiert Konzentration gearbeitet. Als homogener Katalysator wird Wasserstoffperoxid und als heterogener Katalysator Titandioxid eingesetzt. Ziel dieser Untersuchungen ist es, die optimalen Bedingungen für einen schnellen und möglichst vollständigen Abbau der Pharmazeutika herauszufinden.

Mittels zweier verschiedener Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Methoden (HPLC), gekoppelt jeweils mit einem Massenspektrometer (MS), werden die Proben analysiert. Die Analyse beinhaltet die Untersuchung bekannter und unbekannter Photodegradanten. Eine Identifizierung der entstandenen Photodegradanten wird strukturchemisch mittels Tandem-MS und höhere MS/MS ( $MS^n$ ) durchgeführt.

Besonders im Fokus steht die Kinetik der Photodegradation. Bekannt ist, dass der Abbaumechanismus nach Reaktion erster Ordnung verläuft<sup>28,39,45,46</sup>. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für den Wirkstoff ermöglicht eine Vorhersage wann der Wirkstoff aus dem Wasser vollständig abgebaut wird. Zur Visualisierung der erhaltenen Daten wird ein multivariates Verfahren, die Hauptkomponentenanalyse (PCA), eingesetzt. Somit können Trends der photoinduzierten Abbauversuche besser erkannt und dargestellt werden. Die Bestimmung kinetischer Modelle und kinetischer Parameter der entstehenden Degradationsprodukte wurde bis 2016 nicht wissenschaftlich beschrieben<sup>47,48</sup>. Somit war es bisher nicht möglich den zeitlichen Konzentrationsverlauf der Photodegradanten zu beschreiben. In dieser Arbeit werden die entsprechenden kinetischen Untersuchungen vorgenommen, so dass auch der zeitliche Konzentrationsverlauf dieser Degradationsprodukte vorhergesagt werden kann.

Es ist nicht nur wichtig zu wissen, wann der Wirkstoff vollständig abgebaut wird, sondern auch wie sich die entstandenen Photodegradanten unter UV-Bestrahlung in



Wasser verhalten. Durch UV-Bestrahlung von Wirkstoffen können Produkte entstehen, die noch toxischer sein können als der eingesetzte Wirkstoff<sup>43,44</sup>. Zur ökotoxikologischen Bewertung werden Untersuchungen durchgeführt. Dazu wird von allen eingesetzten Wirkstoffen die Minimale Hemmkonzentration (MHK) gegen zwei Bakterienstämme ermittelt. Bei den Bakterienstämmen handelt es sich um das gram-negative Bakterium *Pseudomonas fluorescens* und das gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis*. Darüber hinaus werden bei Bestrahlungsversuchen zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die MHK-Werte bestimmt. Diese MHK-Werte werden mit MHK-Werten der Wirkstoffe verglichen, um die relative ökologische Toxizität von Wirkstoff und Photodegradanten einschätzen zu können. Hierbei wird auch untersucht, wann eine Ökotoxizität ausgeschlossen werden kann.

Da es nicht möglich ist im Rahmen dieser Arbeit einzelne Photodegradanten im Hinblick auf ökotoxikologische Eigenschaften zu analysieren, wird die Abschätzung der entstandenen Photodegradanten auf deren Ökotoxizität mit Hilfe eines multivariaten Verfahrens durchgeführt, der Quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung (*engl.* Quantitative structure-activity relationship: QSAR). Hierbei handelt es sich um ein computergestütztes Verfahren, indem eine Beziehung zwischen biologischer Aktivität und chemischer Struktur vorhergesagt wird. Somit ist es möglich auch die entstandenen Photodegradanten ökotoxikologisch zu bewerten. Hierzu werden zwei verschiedene Software-Produkte zur Kalkulierung der Ökotoxizität verwendet und verglichen.

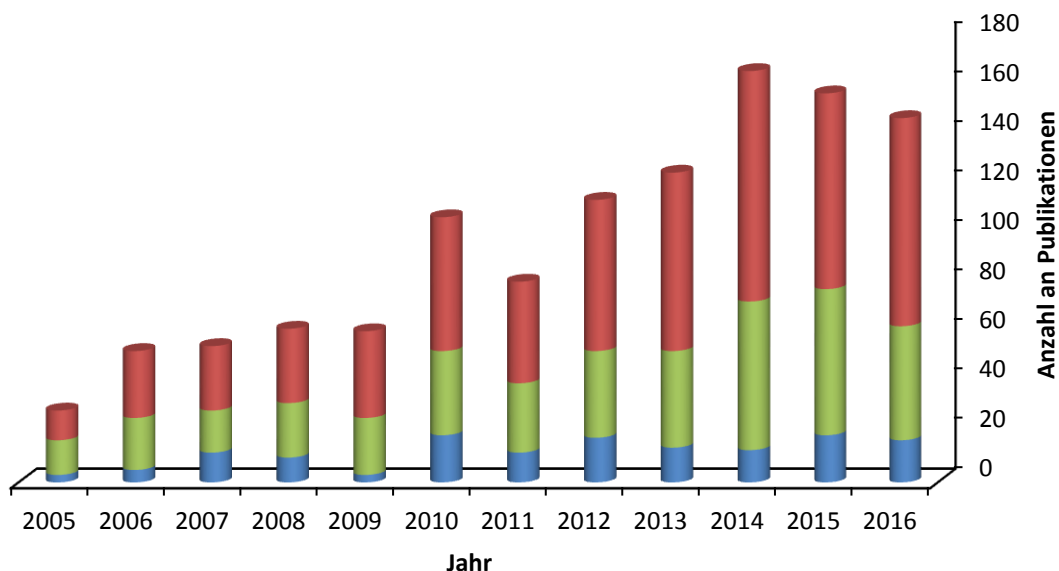
Die meisten photoinduzierten Degradationsexperimente, kurz Abbauversuche, werden in MilliQ-Wasser durchgeführt. Hierbei werden jedoch Matrixeffekte, die in Abwasser herrschen können, ausgeschlossen. Dieser Effekt wird untersucht, indem Wasserproben aus dem Ablauf einer Kläranlage entnommen und mit Antibiotika versetzt werden. Diese Wasserproben werden ebenfalls mit UV-Licht unter verschiedenen Bedingungen bestrahlt und die kinetischen Parameter der Wirkstoffe und Photodegradanten bestimmt. Ein Vergleich zwischen diesen und den Geschwindigkeitskonstanten der Proben in MilliQ-Wasser wird Auskunft darüber geben, welchen Einfluss der Matrixeffekt in Abwasser auf die Abbaugeschwindigkeit hat. Dies ist besonders für die Entwicklung einer vierten Reinigungsstufe in Kläranlagen interessant, da hier das Abwasser der photoinduzierten Degradation ausgesetzt werden kann und die darin vorhandenen

Wirkstoffe abgebaut werden. Des Weiteren wird an Wasserproben die Effektivität der unterschiedlichen Bestrahlungsmethoden untersucht. Dies soll einen Hinweis dafür geben, welche Methode für die Entwicklung einer möglichen vierten Reinigungsstufe am effektivsten ist.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Weltweite Verbreitung Pharmazeutika

Das Auftreten von Arzneimitteln in verschiedenen Gewässern ist ein globales Problem. Typische Konzentrationen der Pharmazeutika liegen im Mikrogrammbereich<sup>1,11,49–53</sup>. Diese Konzentrationen in der Umwelt führen zum Aussterben von Tierarten. Eine statistische Auswertung bei SCOPUS, einer Datenbank für wissenschaftliche Journalbeiträge, zeigte, dass sich die Studien, die sich auf das Auftreten von Pharmazeutika in Gewässern konzentrieren, im letzten Jahrzehnt verfünffacht haben, siehe Abb. 2.1.

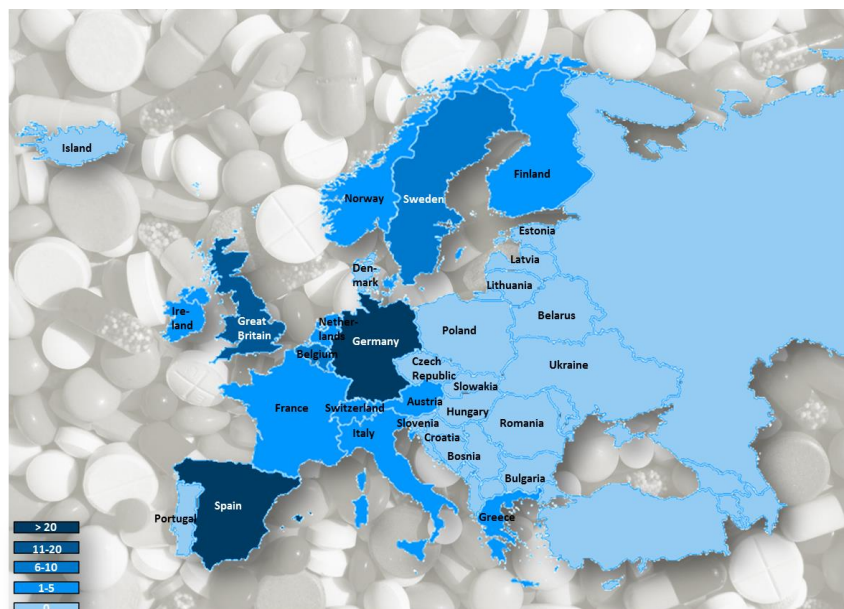


**Abb. 2.1** Anzahl der Veröffentlichungen seit 2005, in der die Anwesenheit von Pharmazeutika in Grundwässern (blau), Oberflächengewässer (grün) und Abwässern (rot) beschrieben werden. Die Auswertung ergab eine Suche bei SCOPUS nach den Termen *occurrence pharmaceuticals wastewater*, *occurrence pharmaceuticals surface water* und *occurrence pharmaceuticals groundwater*.

Es werden immer mehr Pharmazeutika in der Umwelt gefunden. Hauptursache hierfür ist, dass immer mehr Pharmazeutika sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin verschrieben werden. Nur 10 – 70 % der eingenommenen Pharmazeutika werden von Körper absorbiert<sup>54</sup>. Diese gelangen nach vollständiger oder unvollständiger

Metabolisierung über Exkremente und Urin ins Abwasser. Auch die direkte Entsorgung führt dazu, dass die Wirkstoffe in den Wasserkreislauf gelangen<sup>26,54–57</sup>. Herkömmliche Kläranlagen sind nicht mehr in der Lage die Substanzen vollständig aus dem Abwasser zu eliminieren<sup>1,2,49</sup>. Die Pharmazeutika gelangen somit in die Umwelt, vorwiegend in Oberflächengewässer. Die Konzentrationen, die in Oberflächengewässern gefunden werden, liegen im Mikrogrammbereich<sup>1,11,16,24,49,50,58,59</sup>. Es gibt eine begrenzte Anzahl an Reviews die über Arzneimittelkonzentrationen in untersuchten Gewässern zusammengefasst berichten. Jedoch gibt es keine detaillierte Übersicht von Arzneimittelarten, die gefunden wurden und am weitesten verbreitet sind. Genauso wenig gibt es einen Vergleich zwischen verschiedenen Ländern oder Städten, in denen Pharmazeutika in Gewässern vorhanden sein könnten<sup>60</sup>.

Europaweit lässt sich ein Trend erkennen, siehe Abb. 2.2. Keine oder nur sehr wenige Studien waren für eine Reihe von europäischen Ländern öffentlich zugänglich, wie aus den niedrigeren Zahlen der Studien zu erkennen ist. So wurden zum Beispiel für die östlichen Staaten keine Publikationen über die Anwesenheit von Pharmazeutika gefunden<sup>60</sup>. Eine allgemeine europäische Risikobewertung auf Grundlage der verfügbaren Daten scheint zu diesem Zeitpunkt daher nicht möglich.



**Abb. 2.2** Übersicht über die Anzahl an Publikationen über Pharmazeutika in Gewässern europaweit.

Auch in Ländern außerhalb von Europa wurden über den Nachweis von Pharmazeutika in der Umwelt berichtet, zum Beispiel in Amerika<sup>61,62</sup>. Betroffen sind häufig Industrieländer. Eine zuverlässige Beurteilung des Problems in vielen Ländern ist schwierig, da dort nur wenige oder gar keine Studien veröffentlicht oder sogar durchgeführt wurden. Das ist jedoch kein Indiz, dass das Problem dort nicht besteht.

## **2.2 Auswahl der Antibiotika für diese Studie**

Je nach Struktur und deren Wirkungsweise werden Antibiotika in verschiedene Klassen unterteilt. Zu den bekanntesten gehören  $\beta$ -Lactame, Glykopeptide, Polyketide, Chinolone und Sulfonamide. Zu den Polyketiden zählen Tetracycline und Makrolide.

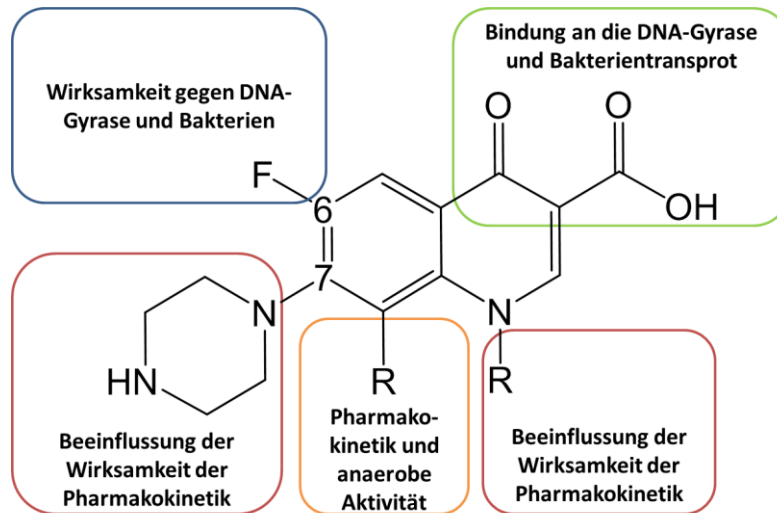
Chinolone können ebenfalls noch weiter unterteilt werden. Bei Vorhandensein eines Fluoratoms am C<sub>6</sub>-Kohlenstoff werden die Chinolone Fluorchinolone genannt. Für diese Studie wurden Fluorchinolone, Makrolide, Sulfonamide und Tetracycline untersucht, die nachfolgend vorgestellt werden.

Die Substanzen Ciprofloxacin, Sulfamethoxazol und Tetracyclin dienten als Referenzsubstanz zur Methodenentwicklung. Die restlichen Fluorchinolone, Sulfonamide und Tetracycline wurden ausgewählt, da sie eine vielversprechende und interessante Photochemie aufweisen könnten. Alle in dieser Studie ausgewählten Makrolide wurden, obwohl Erythromycin häufig im Wasser gefunden wird, bisher sehr wenig untersucht.

### **2.2.1 Fluorchinolone**

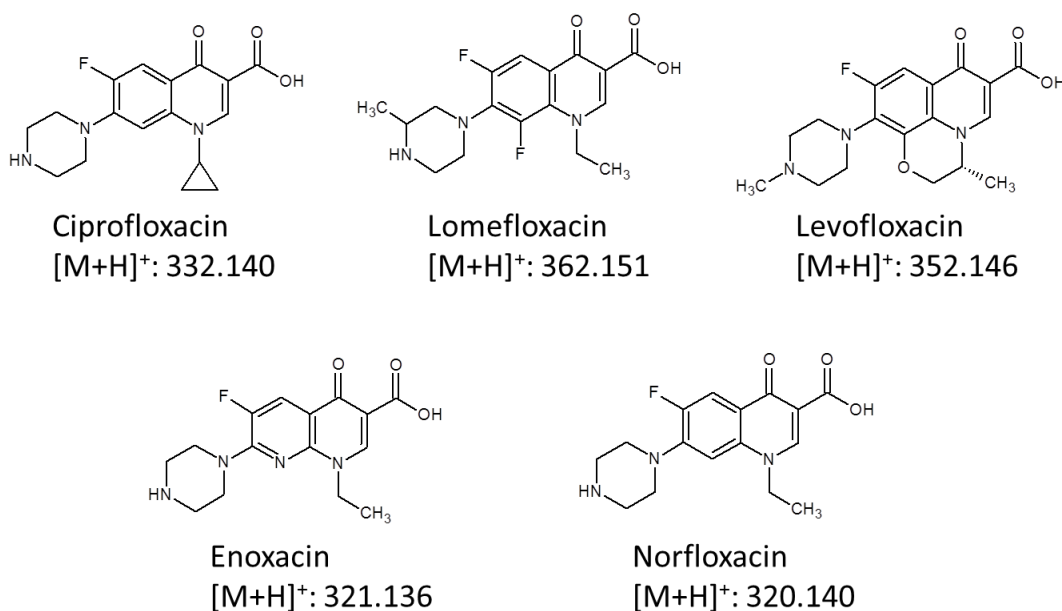
Fluorchinolone werden in der Humanmedizin und Veterinärmedizin eingesetzt<sup>63,64</sup>. Die pharmazeutische Wirksamkeit der Fluorchinolone wird unter anderem durch das Fluoratom an der C<sub>6</sub>-Position und durch die Dialkylaminogruppe an C<sub>7</sub> bestimmt, siehe Abb. 2.3<sup>65-68</sup>. Wenn diese Gruppen beseitigt oder verändert werden, kann dies positive Auswirkung auf die Verminderung der Ökotoxizität haben<sup>69</sup>. Fluorchinolone zählen zu den Gyrasehemmern. Neuere Fluorchinolone wirken auch gegen andere Erreger-Enzyme, so dass die Bezeichnung international unüblich ist<sup>64</sup>.

Die Pharmakokinetik beschreibt alle Prozesse, denen ein Arzneimittel im Körper unterliegt. Zu diesen Prozessen zählen die Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion. Die Pharmakokinetik kann ebenfalls durch unterschiedliche funktionelle Gruppen beeinflusst werden, siehe Abb. 2.3.



**Abb. 2.3** Beeinflussung der Wirksamkeit der Fluorchinolone in Anlehnung an Andersson und MacGowan<sup>70</sup>

In dieser Arbeit wurden detaillierte Untersuchungen an fünf verschiedene Fluorchinolonen vorgenommen, die in Abb. 2.4 dargestellt sind. Angegeben ist zusätzlich die Massen der quasimolekularen Ionen  $[M+H]^+$  der Fluorchinolone, da in dieser Arbeit mit Massenspektrometern im positiven Modus gearbeitet wird und diese Massen detektiert werden.



**Abb. 2.4** Strukturformel ausgewählter Fluorchinolone und theoretische Massenwerte ihrer Quasimolekülonen [M+H]<sup>+</sup>.

Bereits in der Vergangenheit wurde die Photodegradation von Ciprofloxacin in zahlreichen Studien untersucht. Dennoch wird auch weiterhin regelmäßig über die photoinduzierte Degradation von Ciprofloxacin berichtet. Im Jahr 2016 betrug die Anzahl an Publikationen über die Photodegradation von Ciprofloxacin 25 bei Lomefloxacin 2 und Norfloxacin 8. Über Enoxacin und Levofloxacin konnte keine Literatur aus dem Jahr 2016 gefunden werden [Stand 27.01.2017, SCOPUS].

Ciprofloxacin wird unter den Fluorchinolonen am häufigsten in verschiedenen Gewässern gefunden. Eine Übersicht der fünf Fluorchinolone in verschiedenen Gewässerarten ist in Tab. 2.1 dargestellt.

Es konnten umfangreiche Berichte bzgl. der Anwesenheit von Ciprofloxacin und Norfloxacin in Gewässern gefunden werden, über Enoxacin, Lomefloxacin und Levofloxacin fast keine. Eventuell war die Konzentration dieser Fluorchinolone so gering, so dass diese durch herkömmliche Methoden nicht detektiert wurden oder diese Substanzen konnten vollständig in Klärwerken eliminiert werden. Allgemein lässt sich sagen, dass die Konzentrationen in Oberflächenwässern geringer sind als in Kläranlagenwässern. Dies liegt daran, dass eine Verdünnung von Kläranlagenwässern in Oberflächenwässern stattfindet. Auch in Haushaltsabwässern konnten im Vergleich zu

Oberflächenwässern erhöhte Werte nachgewiesen werden, da viele Menschen ihre Pharmazeutika im Abwasser entsorgen. Dennoch konnten in Kläranlagenwässern höhere Konzentrationen nachgewiesen werden, da hier neben den Haushaltsabwässern auch noch das Abwasser von Krankenhäusern und Industrie zusammen kommen. Auch regional konnten Unterschiede festgestellt werden. So ist zum Beispiel die Konzentration von Ciprofloxacin in den Haushaltsabwässern in den USA höher als in der Schweiz.

**Tab. 2.1 Konzentrationen von Fluorchinolonen in verschiedenen Gewässern**

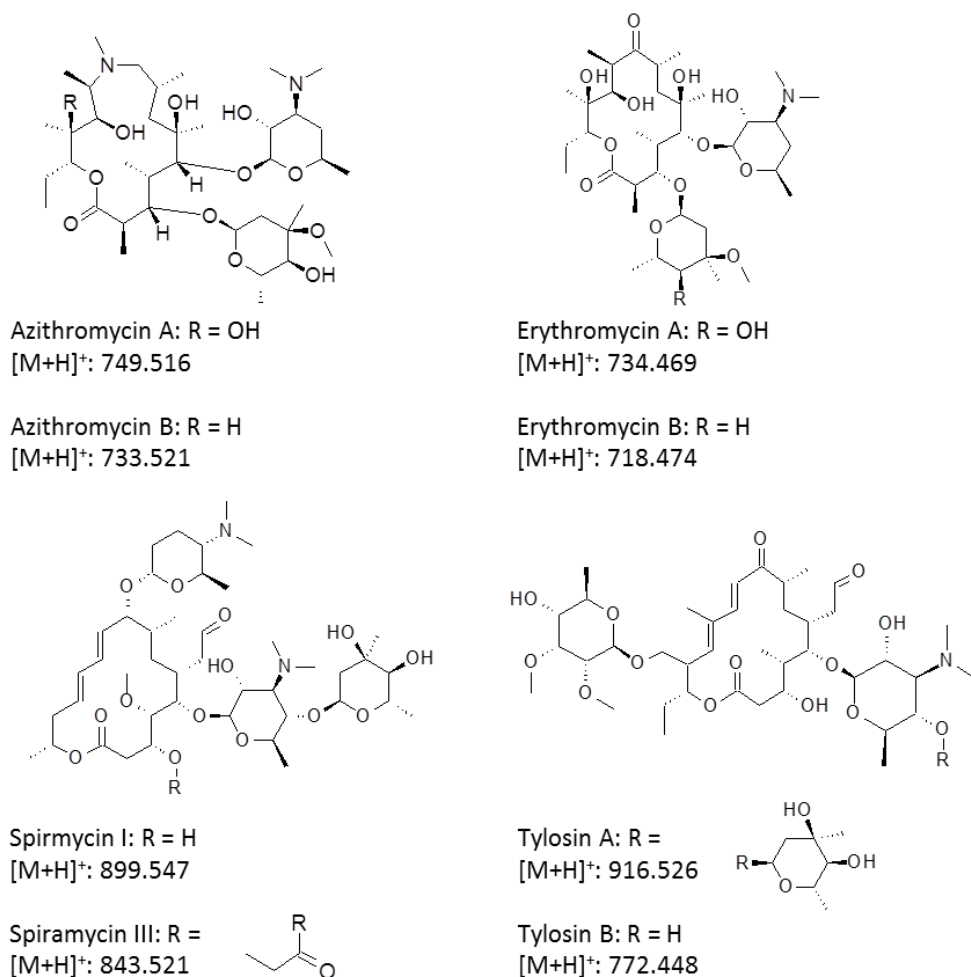
Fluorchinolon	Gewässerart	Land	Konzentration /ng·L <sup>-1</sup>	Referenz
<b>Ciprofloxacin</b>	Haushaltsabwasser	USA	900-1300	71
		Schweiz	249-405	72
	Kläranlagenzulauf	Australien	3800-4600	27
		USA	310	73
	Kläranlagenablauf	Australien	640-720	27
		USA	310	73
		Spanien	305	74
		USA	213 – 531	71
	Oberflächenwässer	Spanien	32-115	75
		USA	12-102	71
		Deutschland	9	76
<b>Enoxacin</b>	Oberflächenwässer	Spanien	7-140	75
<b>Norfloxacin</b>	Haushaltsabwasser	Schweiz	45-120	72
		USA	84-86	71
	Kläranlagenzulauf	USA	250	73
		Australien	170-210	27
	Kläranlagenablauf	Spanien	2968	74
		USA	330	73
		Australien	25-40	27
		USA	13-14	71
	Oberflächenwässer	Spanien	22-89	75

### 2.2.2 Makrolide

Makrolide zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus einem mehrgliedrigen Laktonring bestehen. An diesem Laktonring befinden sich verschiedene Zuckermoleküle, wie zum Beispiel Desosamin, Cladinose oder Mycaminose, die für die Wirkung von Makroliden mitverantwortlich sind<sup>77,78</sup>.



Für diese Arbeit wurden vier Makrolide ausgesucht. Neben dem in Gewässern häufig gefundenen Makrolid Erythromycin wurden Azithromycin, Spiramycin und Tylosin untersucht, siehe Abb. 2.5.



**Abb. 2.5** Strukturformel ausgewählter Makrolide und theoretische Massenwerte ihrer Quasimolekülonen [M+H]<sup>+</sup>.

Bei den Makroliden handelt es sich um chemisch modifizierte Naturprodukte, die fermentativ gewonnen werden. Sie liegen daher als Gemische, die sich hinsichtlich ihrer Zuckersubstituenten unterscheiden und mit A, B, C und/oder D bezeichnet werden, vor und werden dann synthetisch verändert. Azithromycin, Erythromycin, Spiramycin und Tylosin bestehen daher aus Mischungen. Azithromycin und Erythromycin werden in der Humanmedizin, Spiramycin und Tylosin in der Veterinärmedizin eingesetzt<sup>63</sup>.

Erythromycin besitzt einen 14-gliedrigen Laktoring mit zwei Zuckermolekülen, dem neutralen Zucker Cladinose und dem Amino-Zucker Desosamin. Eine ähnliche Struktur weist das Azithromycin auf. Hier ist im Laktoring ein methyliertes Stickstoffatom vorhanden, das die Substanz säurestabiler als Erythromycin macht <sup>79</sup>.

Spiramycin enthält drei Zuckersubstituenten, Forosamin, Mycaminose, und Mycarose. Das Mycaminose-Mycarose Disaccharid befindet sich auch in Tylosin. Das dritte Zuckermolekül am Tylosin ist Mycinose, vgl. Abb. 2.5. In der nun nachfolgenden Tabelle 2.2 ist eine Auswahl von Studien, die Konzentrationen in verschiedenen Gewässerarten untersucht haben, zusammengefasst.

**Tab. 2.2 Konzentrationen von vier untersuchten Makroliden in verschiedenen Gewässerarten weltweit**

Makrolid	Gewässerart	Land	Konzentration /ng·L <sup>-1</sup>	Referenz
<b>Anhydro-Erythromycin</b>	Grundwasser	Deutschland	49-300	80
	Oberflächenwässer	Wales	7-22	81
	Kläranlagenzulauf	USA	3900	73
	Kläranlagenablauf	USA	1100	73
<b>Azithromycin</b>	Oberflächenwässer	Deutschland	2-13	76
		Spanien	19-36	75
	Kläranlagenablauf	Spanien	69	74
		Schweiz	295	82
<b>Erythromycin</b>	Oberflächenwässer	Deutschland	4-190	76
		Spanien	12-51	75
	Kläranlagenablauf	Spanien	78	74
<b>Spiramycin</b>	Oberflächenwässer	Spanien	63-488	75
		China	2.92-5.75	83,84
	Kläranlagenablauf	Italien	12-418	85,86
<b>Tylosin</b>	Oberflächenwässer	Spanien	1	75
	Kläranlagenzulauf	USA	1500	73
		Australien	55	27
		USA	720	73
	Kläranlagenablauf	Australien	65	27

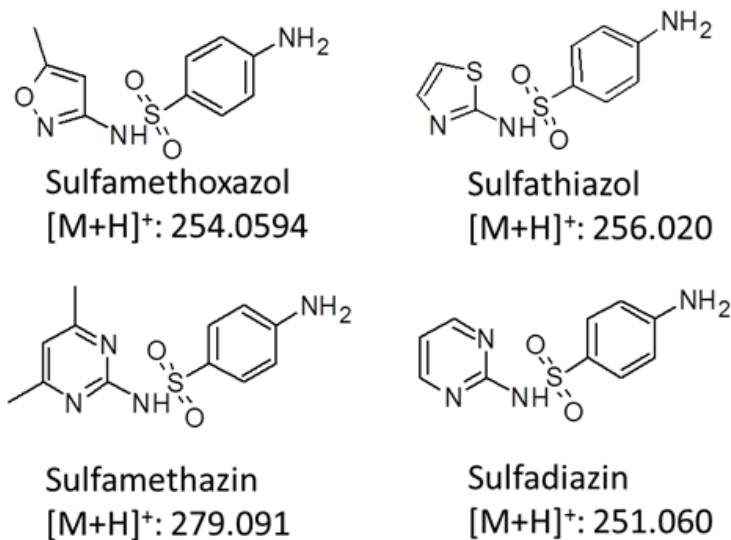
Auch hier konnten in Kläranlagenwässern deutlich höhere Konzentrationen gefunden werden als in den übrigen Wasserarten, wobei die Makrolidkonzentration in

Zulaufproben mindestens doppelt so hoch ist wie die in Ablaufproben. Somit kann ein Teil der Makrolide in der Kläranlage aus dem Wasser eliminiert werden.

Erythromycin wird häufig als Anhydro-Erythromycin gefunden. Dies bildet sich aus Erythromycin A, indem ein Wassermolekül abgespalten wird. Besonders in sauren Lösungen wird diese Reaktion bevorzugt<sup>48,79,87,88</sup>. Bei den anderen Makroliden konnte diese Wasserabspaltung bisher nicht beobachtet werden. Des Weiteren sind Makrolide besonders im sauren Milieu instabil, so dass ein chemischer Abbau der Substanzen schon vor Beginn eines Degradationsversuches stattfindet<sup>48,87-96</sup>.

### 2.2.3 Sulfonamide

Die Arbeit befasst sich mit vier Sulfonamiden, die in Abb. 2.6 dargestellt sind. Ihr Vorkommen in Gewässern ist in Tab. 2.3 dargestellt. Sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin werden diese Substanzen eingesetzt<sup>63</sup>. Sulfamethoxazol wird nur noch in Verbindung mit Trimethoprim als Kombinationspräparat angewendet<sup>63</sup>.



**Abb. 2.6** Strukturformel ausgewählter Sulfonamide und theoretische Massenwerte ihrer Quasimolekülonen [M+H]<sup>+</sup>.

In Abb. 2.6 fällt auf, dass die untersuchten Sulfonamide aus einem Sulfanilamid mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen bestehen. Das Sulfanilamid kann nicht modifiziert werden ohne die antibakterielle Wirkung zu vermindern, die funktionellen

Gruppen dagegen schon. Hier kann die Wirksamkeit durch Veränderung der funktionellen Gruppe erhöht werden.

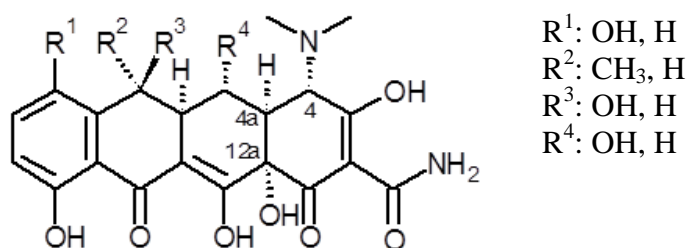
**Tab. 2.3 Konzentrationen der Sulfonamide in verschiedenen Gewässern (Auswahl)**

<b>Sulfonamid</b>	<b>Gewässerart</b>	<b>Land</b>	<b>Konzentration /ng·L<sup>-1</sup></b>	<b>Referenz</b>
<b>Sulfadiazin</b>	Oberflächenwässer	Spanien	16-23	75
	Kläranlagenablauf	Spanien	36	74
<b>Sulfamethazin</b>	Kläranlagenzulauf	USA	300	73
	Kläranlagenablauf	Spanien	236	74
		USA	10	73
<b>Sulfamethoxazol</b>	Trinkwasser	USA	13,7	97
		Deutschland	410	80
		Deutschland	4-52	76
		Spanien	29-55	75
		Polen	26-60	81
	Kläranlagenzulauf	Australien	360-500	27
		USA	310	73
	Kläranlagenablauf	Spanien	999	74
		Australien	270-320	27
		USA	40	73
		Schweiz	578	82
<b>Sulfathiazol</b>	Kläranlagenzulauf	USA	300	73
		Australien	2-40	27
	Kläranlagenablauf	Australien	5	27
		USA	40	73

Alle vier untersuchten Sulfonamide wurden in verschiedenen Gewässerarten weltweit gefunden. Häufig vorgefunden wurde Sulfamethoxazol mit den höchsten Konzentrationen in Kläranlagenwässern. Der Vergleich zwischen Zu- und Ablauf zeigte, dass die Hälfte an Sulfamethoxazol in der Kläranlage eliminiert wird. Bei Sulfamethazin und Sulfathiazol konnte dagegen eine stärkere Eliminierung durch die Kläranlage erreicht werden.

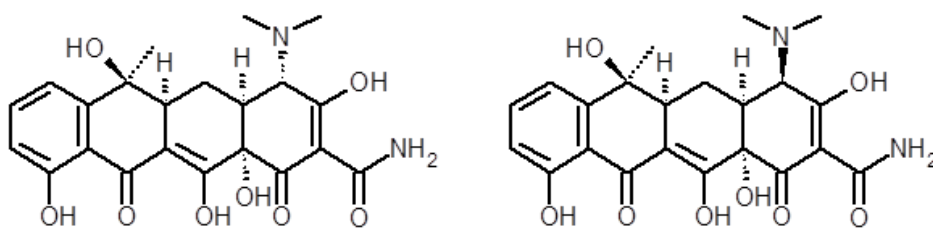
### 2.2.4 Tetracycline

Charakteristisch für Tetracycline sind die vier 6-gliedrigen Kohlenstoffringe. Tetracycline werden in der Humanmedizin eingesetzt<sup>63</sup>. Eine allgemeine Struktur ist in Abb. 2.7 dargestellt.



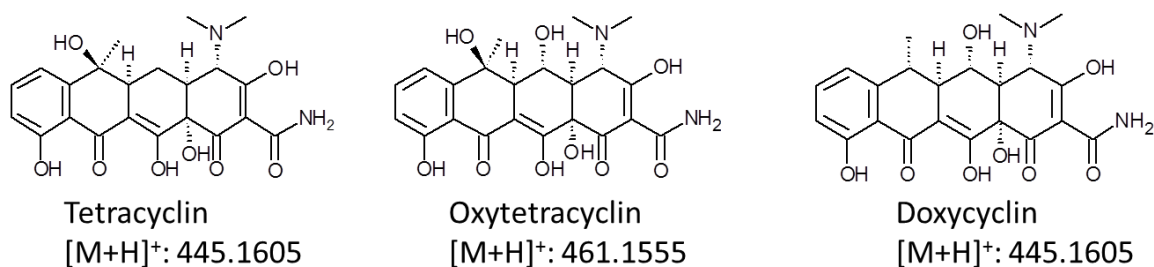
**Abb. 2.7** Allgemeine Struktur von Tetracyclinen

Eine Analyse zwischen der Struktur der Tetracycline und der pharmazeutischen Aktivität *in vivo* hat ergeben, dass die Aktivität dieser Antibiotikaklasse bestehen bleibt, wenn die allgemeine Struktur von Tetracyclinen und die stereochemischen Merkmale, Abb. 2.7, aufrecht erhalten bleiben. Die Gruppen  $R^1$  bis  $R^4$  können hierbei variiert werden, ohne dass eine wesentliche Abnahme der antimikrobiellen Aktivität erzeugt wird<sup>98</sup>. Für die Aktivität ist die richtige Konfiguration am C<sub>4</sub>-Atom verantwortlich. Dies konnten McCormick *et al.* bereits an Tetracyclin nachweisen, siehe Abb. 2.8<sup>99</sup>.



**Abb. 2.8** Aktives Tetracyclin (links) und wenig aktives 4-Epi-Tetracyclin (rechts).

Auch andere stereochemische Konfigurationsänderungen, wie die Veränderung am C<sub>4a</sub>-Kohlenstoff oder am C<sub>12a</sub>-Kohlenstoff, führen zur Inaktivierung von Tetracyclinen<sup>100,101</sup>. Drei Tetracycline wurden in dieser Arbeit untersucht. Sie sind in Abb. 2.9 dargestellt.



**Abb. 2.9** Strukturformel ausgewählter Tetracycline und theoretische Massenwerte ihrer Quasimolekülonen [M+H]<sup>+</sup>.

Auch Tetracycline werden regelmäßig in Wasserproben identifiziert. Ihr Vorkommen in verschiedenen Wässern ist in Tab 2.4 dargestellt.

**Tab. 2.4** Konzentrationen von Tetracyclinen in verschiedenen Gewässern (Auswahl)

Tetracyclin	Gewässerart	Land	Konzentration /ng·L <sup>-1</sup>	Referenz
<b>Doxycyclin</b>	Oberflächenwässer	Spanien	14-47	75
	Kläranlagenablauf	Australien	40	27
	Kläranlagenzulauf	Australien	65	27
<b>Oxytetracyclin</b>	Oberflächenwässer	Spanien	14-37	75
	Kläranlagenablauf	Australien	20	27
<b>Tetracyclin</b>	Oberflächenwässer	Spanien	69-228	75
	Kläranlagenzulauf	Australien	35	27
	Kläranlagenablauf	Australien	30	27

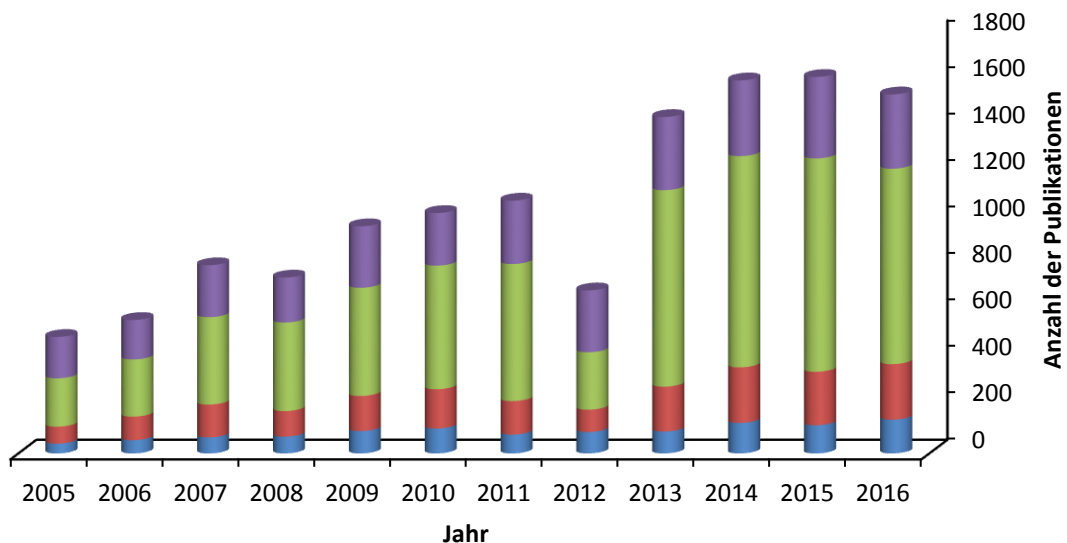
In den Wässern konnten alle drei untersuchten Tetracycline nachgewiesen werden. In Oberflächenwässern betrugen die Konzentrationen von Doxycyclin und Oxytetracyclin zwischen 14 und 47 ng/L. Die Konzentration von Tetracyclin dagegen war höher in Oberflächenwässern als in Kläranlagenwässern. Das Oberflächenwasser stammt aus Spanien, das Kläranlagenwasser aus Australien. Somit ist ein Bezug zwischen diesen beiden Gewässerarten nicht möglich, da es regionale Unterschiede gibt. Für Tetracyclin konnten keine Werte für Kläranlagenwässer in Spanien gefunden werden.

### 2.3 Advanced Oxidation Processes (AOPs)

Die meisten Kläranlagen werden mit drei Reinigungsstufen betrieben. In der ersten Stufe, in der mechanische und physikalische Prozesse, wie Rechen, Sandfang und Ausfällen von Schwermetallen, stattfinden, werden grobe Substanzen aus dem Zulauf herausgesiebt. In der zweiten Stufe, der biologischen Stufe, werden hauptsächlich biologische Verunreinigungen durch Einsatz von aeroben Bakterien entfernt. Auch können organische Substanzen von Mikroorganismen abgebaut werden und anorganische Substanzen werden teilweise oxidiert. Zum Schluss, in der dritten Stufe, kommen chemische und physikalische Prozesse zum Einsatz, die zum Beispiel zur Neutralisation führen aber auch andere Parameter, wie zum Beispiel Phosphat- und Nitratgehalt, optimieren. Hauptursache für den Eintrag von Antibiotika in die Umwelt innerhalb einer Kläranlage ist die Unwirksamkeit der biologischen Stufe gegenüber ausgewählten chemischen Stoffen. Pharmazeutika zeigen sich resistent gegen die Bakterien bzw. Mikroorganismen<sup>14,102,103</sup>. Somit können Pharmazeutika nicht oder nur teilweise in der Kläranlage abgebaut bzw. eliminiert werden. Auch kann es vorkommen, dass die Bakterien von den Pharmazeutika getötet werden, so dass eine Elimination nicht mehr möglich ist.

Als Lösung für dieses Problem wird der Einsatz einer vierten Reinigungsstufe unter Verwendung von Advanced Oxidation Processes (AOPs) vorgeschlagen<sup>104–106</sup>. Zentrales Element bei dem Einsatz der AOPs ist die Erzeugung von Hydroxylradikalen. Diese Radikale besitzen nach Fluor, 3.03 V, das höchste Oxidationspotential, 2.80 V<sup>28,32,39</sup>. Sie können durch verschiedene Methoden erzeugt werden. Zu den in dieser Arbeit angewendeten Methoden gehören die direkte Photolyse von Wasser durch VUV/UVC-Bestrahlung, durch Zugabe von Wasserstoffperoxid und UVC-Bestrahlung, mit Hilfe von Titandioxid und UVA-Bestrahlung, die in den nachfolgenden Kapiteln detaillierter vorgestellt werden<sup>2,28,30,39,107–110</sup>. Zu den weiteren Methoden zur Erzeugung von OH-Radikalen zählen die Photo-Fenton-Reaktion, elektrochemische Reaktionen und die Ozonierung<sup>30,32,57,111–113</sup>.

Welche Methoden in den letzten zehn Jahren allgemein am häufigsten angewendet wurden, wurde mittels SCOPUS ermittelt. Eine Übersicht ist in Abb. 2.10 dargestellt.



**Abb. 2.10** Übersicht über die Publikationen der Jahre 2005 bis 2016 über die AOPs. Folgende AOPs wurden berücksichtigt: Photo-Fenton (blau), UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rot), UV/TiO<sub>2</sub> (grün) und Ozonierung (lila).

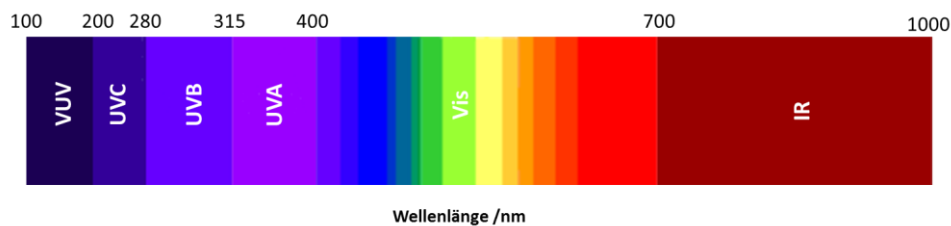
Nicht nur die Anzahl der Publikationen über die Anwesenheit von Pharmazeutika in Gewässern, siehe Kapitel 2.1, ist angestiegen, sondern auch die Anzahl der Publikationen bezüglich der Anwendung von AOPs. Dies liegt daran, dass nicht nur immer mehr Substanzen in Gewässern gefunden werden, sondern eine schnellstmögliche Elimination dieser Substanzen aus dem Wasserkreislauf herbeigeführt werden soll, um die Umwelt zu schonen. Die häufigste Methode, die dabei verwendet wird, ist der Einsatz von Titandioxid unter Verwendung von UV-Lampen, gefolgt von der Kombination UV-Bestrahlung mit Wasserstoffperoxid-Zugabe und Ozonierung. Der Abbau durch Photo-Fenton Ansätze wird dagegen nicht so häufig untersucht. Nachfolgend werden die wichtigsten AOPs bzw. deren Verfahren vorgestellt, die in dieser Arbeit angewandt werden.

### 2.3.1 Photolyse induziert durch UVA- und UVC-Bestrahlung

Das Spektrum der Sonne reicht von Röntgenstrahlung einer Wellenlänge von 0.1 nm bis zu Radiowellen mit Wellenlängen > 10 mm. Interessant in dieser Arbeit ist der UV-Bereich. UV-Licht wird in vier verschiedene Bereiche eingeteilt: UVA, das von 380 nm bis 315 nm reicht, verursacht auf der Haut die Sonnenbräune. Von 315 nm bis 280 nm



liegt der UVB-Bereich. Diese Strahlung verursacht bei den Menschen Sonnenbrand und Hautkrebs. UVC-Strahlung liegt zwischen 280 nm und 200 nm. Diese Strahlung wird zum Beispiel von Proteinen, DNA und RNA absorbiert. Der letzte Bereich ist die Vakuum-UV-Strahlung. Dieser Bereich umfasst 200 nm bis 100 nm und wird häufig der UVC-Strahlung zugeordnet. Alle Substanzen, darunter Wasser, molekularer Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid absorbieren diese Strahlung. Ein Auszug aus dem elektromagnetischen Spektrum ist in Abb. 2.11 dargestellt.



**Abb. 2.11** Ausschnitt des elektromagnetischen Spektrums von 100 – 1000 nm.

Mit Hilfe der Vakuum-UV-Strahlung ist es möglich, Wasser in OH-Radikale zu spalten, siehe Gleichung 2.1<sup>28,114–121</sup>.



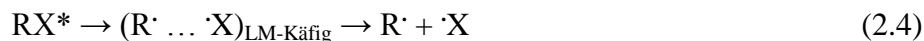
Auch der Sauerstoffgehalt in einer Lösung kann Einfluss auf eine Reaktion unter UV-Bestrahlung haben<sup>122</sup>. Bei Anwesenheit von Sauerstoff kann das Wasserstoffradikal, das aus Wasser zusammen mit dem Hydroxylradikal bei einer Bestrahlung von 185 nm gebildet wird, mit Sauerstoff zum Hydroperoxyl-Radikal reagieren, siehe Gleichung 2.2<sup>118</sup>.



Je nachdem wie stark die jeweilige UV-Aktivität einer Substanz ist, können Substanzen durch UV-Bestrahlung abgebaut werden. Durch die UV-Absorption wird das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand überführt, siehe Gleichung 2.3. Dieser Zustand kann entweder durch physikalische Prozesse, wie zum Beispiel Emission, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz, oder durch chemische Prozesse, e.g. Reaktionen, in den Grundzustand zurückgeführt werden<sup>39,123,124</sup>.



Die homolytische Spaltung der Bindung ist die bevorzugte Reaktion und tritt im Lösungsmittelkäfig auf, siehe Gleichung 2.4.



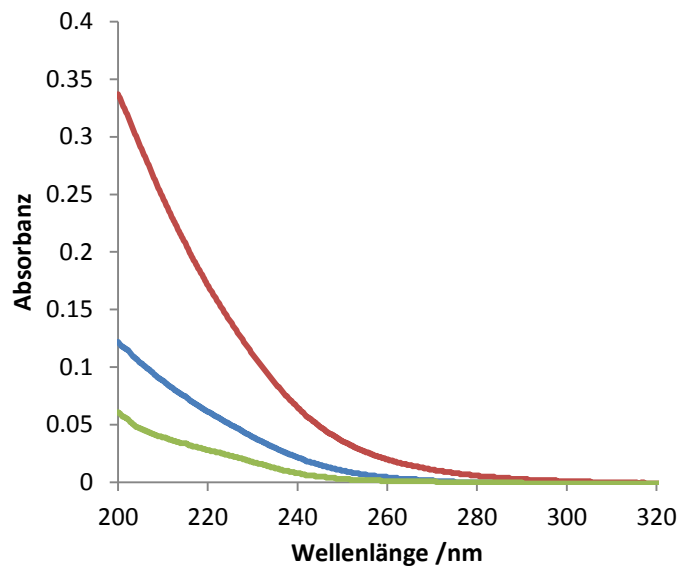
Die Radikale  $R^\cdot$  und  $X^\cdot$  können unter bestimmten Bedingungen wieder zur Ausgangssubstanz zurückreagieren, aber auch mit dem gelösten Sauerstoff, der im Lösungsmittel vorhanden ist, zu Peroxyl- ( $R-O_2^\cdot$ ) oder Oxyl-Radikale ( $R-O^\cdot$ ) reagieren, so dass die Substanz durch Weiterreaktion abgebaut wird<sup>39</sup>.

Auch kann der angeregte Zustand der Substanz durch eine Reaktion mit Sauerstoff eine Reaktion eingehen, so dass ein Superoxidradikal aus Sauerstoff entsteht, siehe Gleichung 2.5. Diese Superoxidradikale können ebenfalls zum Abbau der Substanz beitragen<sup>39</sup>.



### 2.3.2 Anwesenheit von $H_2O_2$

Anhand des Absorptionsspektrums von  $H_2O_2$  lässt sich erkennen, dass  $H_2O_2$  die kurzwelligen UV-Strahlen recht gut absorbiert, siehe Abb. 2.12. Die Absorption bei 254 nm dagegen ist sehr schwach. Dies zeigt auch der ermittelte Extinktionskoeffizient. Der Extinktionskoeffizient bei verschiedenen pH-Werten beträgt bei 254 nm 18 L mol/cm. Dieser Wert stimmt mit dem von Liu *et al.* gemessenen 20 L mol/cm gut überein<sup>125</sup>.



**Abb. 2.12** UV/Vis Spektren von einer Lösung mit Konzentrationen von 10 mg/L (grün), 30 mg/L (blau) und 100 mg/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  (rot) bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm

In Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  entstehen durch UV-Licht OH-Radikale, die organische Substanzen bis zur Mineralisierung abbauen können, siehe Gleichung 2.6<sup>32,116,126–129</sup>.



Allerdings kann dies auch bei zu hoher Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu unerwünschten Nebenreaktionen führen oder zu Abbruchreaktionen, siehe Gleichungen 2.7 bis 2.9<sup>32,39,126</sup>.



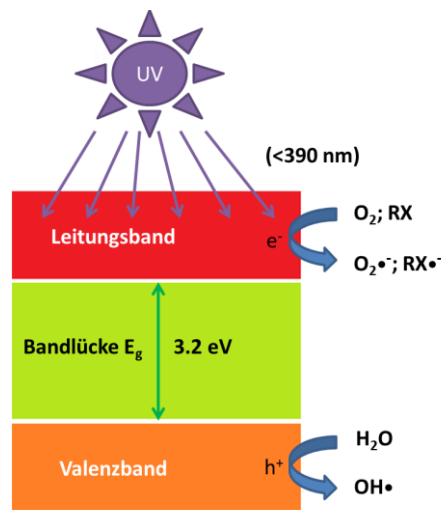
### 2.3.3 $\text{TiO}_2$ als heterogener Katalysator

Ein weit verbreiteter Photokatalysator ist  $\text{TiO}_2$ . Durch Bestrahlung mit UV-Licht können organische Substanzen auf der Oberfläche von  $\text{TiO}_2$  zersetzt werden.  $\text{TiO}_2$  ist ein Halbleiter, der durch UV-Bestrahlung Elektronen-Loch-Paare ( $e^-$  und  $h^+$ ) bilden kann,

wenn die Energie der Photonen größer ist als die Bandlücke  $E_g$ . Die Bildung der Elektronen-Loch-Paare durch UV-Bestrahlung ist in Gleichung 2.10 dargestellt.

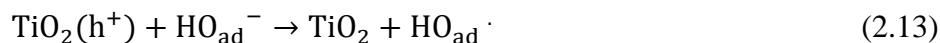
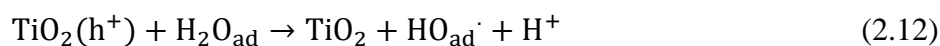
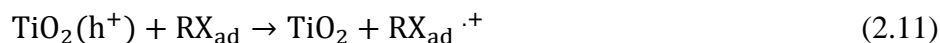


Die Löcher diffundieren an die Oberfläche von  $\text{TiO}_2$  und es können Reaktionen von  $e^-$  und  $h^+$  mit Substanzen, die an der Oberfläche adsorbieren, stattfinden, siehe Abb. 2.13.



**Abb. 2.13** Schematische Darstellung der Photokatalyse mit  $\text{TiO}_2$  in Anlehnung an Li *et al.*<sup>130</sup>

Am Leitungsband finden Oxidationsreaktionen statt, am Valenzband Reduktionen. Die Substanz, Wasser und Sauerstoff können an der  $\text{TiO}_2$ -Oberfläche adsorbieren. Aus den Substanzen, die an der  $\text{TiO}_2$ -Oberfläche adsorbieren entstehen Radikale, siehe Gleichung 2.11. Diese Radikale können weiter reagieren, so dass die Substanz abgebaut wird. Aus dem Wasser entstehen OH-Radikale, siehe Gleichungen 2.12 und 2.13. Die OH-Radikale können nun organische Substanzen zersetzen und im Idealfall tritt eine vollständige Mineralisierung ein<sup>28,30,32,39,129</sup>.



Auch die Anwesenheit von Sauerstoff in der Lösung kann Einfluss auf den Mechanismus haben. Das Elektron kann Sauerstoff reduzieren. Es entsteht das Superoxid-Radikal-Anion, siehe Gleichung 2.14. Das Superoxid-Radikal-Anion wird weiter zu Wasserstoffperoxid umgewandelt, siehe Gleichungen 2.15 und 2.16. Wasserstoffperoxid kann, wie schon beschrieben, durch UV-Bestrahlung in zwei OH-Radikale gespalten werden, siehe Gleichung 2.6, oder es reagiert ebenfalls mit dem  $\text{TiO}_2(e^-)$ , siehe Gleichung 2.17.

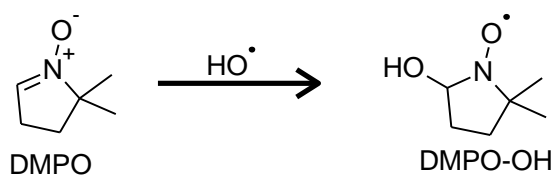


$\text{TiO}_2$  tritt in der Natur in drei verschiedenen Modifikationen auf; Anatas, Brookit und Rutil. Für die UV-Bestrahlung erwiesen sich Anatas (3.2 eV) und Rutil (3.0 eV) als effiziente Modifikation für die Photokatalyse. Die Energie von Anatas und Rutil entspricht einer Wellenlänge von etwa 390 nm und somit ist der UVA-Bereich für eine erfolgsversprechende Photoreaktion relevant. Vorteilhaft beim Einsatz von  $\text{TiO}_2$  wäre eine Verwendung von Sonnenlicht, das jedoch bei der industriellen Umsetzung aufgrund der geringen Strahlungspenetration nicht effektiv oder nicht mit ausreichender bzw. konstanter Intensität vorhanden ist<sup>32</sup>.

Wie in diesem Kapitel gezeigt, existieren viele Reaktionsmechanismen, die zur Bildung der für den photoinduzierten Abbau organischer Substanzen, wie zum Beispiel Pharmazeutika, essentiell wichtigen OH-Radikale führen. Welcher Mechanismus der effektivste ist, wird in dieser Arbeit untersucht.

### 2.3.4 Nachweis von OH-Radikalen mittels ESR-Spektroskopie

Die Anwendung von AOPs zeigt, dass die Entstehung der OH-Radikale essentiell für den Abbau der Substanz ist. Die gebildeten OH-Radikale lassen sich mittels ESR-Spektroskopie nachweisen, indem 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxid (DMPO) zu der Lösung hinzugefügt wird, siehe Abb. 2.14<sup>126,131,132</sup>.



**Abb. 2.14**      **Reaktionsgleichung zum Nachweis von OH-Radikalen mittels DMPO**

Viele Radikale sind reaktiv und daher instabil. Um diese dennoch beobachten zu können werden sogenannte Spin-Traps oder Spin-Fänger, wie hier das DMPO, eingesetzt. Die Radikale bilden mit dem Spin-Trap ein stabiles Addukt, das dann mit ESR-Spektroskopie nachgewiesen und analysiert werden kann. Hier entsteht ein stabiles sterisch gehindertes Nitroxid-Radikal. Das Stickstoffisotop  $^{14}\text{N}$  besitzt einen Kernspin von 1. Als ESR-Signal resultiert daher ein Triplet. Darüber hinaus findet eine Wechselwirkung mit dem am Stickstoff benachbarten Kohlenstoffatom Wasserstoffatom statt. Das Wasserstoffatom besitzt einen Kernspin von  $\frac{1}{2}$ . Das Triplet wird zu einem Triplet auf Duplet. Da in diesem Fall  $^{14}\text{N}$  und  $^1\text{H}$  gleiche Kopplungskonstanten  $a_{\text{H}}$  und  $a_{\text{N}}$  aufweisen, resultiert ein Quartett mit Intensitätsverteilung 1:2:2:1.

## 2.4 Kinetik der Photodegradation

Organische Substanzen lassen sich mit Hilfe von UV-Strahlung zerstören oder abbauen. Man spricht hierbei von Photodegradation. Betrachtet man den Verlauf der Konzentration-Zeit Kurve der organischen Substanz, so lässt sich der Abbau in der Regel einer Kinetik erster Ordnung beschreiben. Bei dem Abbau entstehen aus den organischen Substanzen sogenannte Photodegradanten oder Zwischenprodukte, die ebenfalls abgebaut werden. In Studien, in der Pharmazeutika durch UV-Strahlung abgebaut wurden, wurde bis 2016 nicht auf die Kinetik der Abbauprodukte eingegangen. Häufig wurden die einzelnen Messwerte in den Konzentrations-Zeit Kurven einfach linear, ohne den vornehmlich exponentiellen Zusammenhang zu berücksichtigen, verbunden, wie zum Beispiel in Studien von Nasuhoglu *et al.* und An *et al.*<sup>31,133</sup>. Auch Polynomkurven wurden als Beschreibung für den Konzentrations-Zeit Verlauf verwendet, wie zum Beispiel bei Lutterbeck *et al.*<sup>134</sup>. Tseng *et al.* untersuchten die photokatalytische Degradation von Monochlorbenzol. Hierbei wurde der Abbau als Folge-Reaktion beschrieben<sup>135</sup>.

Die Konzentrations-Zeit Kurven von Zwischenprodukten weisen einen sigmoidalen Anstieg auf, was auf eine Folgereaktion hinweist. Zwischenprodukte können als Folge- oder Folge-Folge-Reaktion beschrieben werden<sup>48,96</sup>. Gleichung 2.18 beschreibt die allgemeine Reaktionsgleichung einer Folge-Reaktion und Gleichung 2.19 eine Folge-Folge Reaktion<sup>48,96,136,137</sup>.



Substanz A wird zu Zwischenprodukt B umgeformt, Zwischenprodukt B zu C und C zu D. Die Geschwindigkeitskonstanten zu den Reaktionen sind  $k_1$ ,  $k_2$  und  $k_3$ .

Die Abnahme der Substanz A mit einer Anfangskonzentration von  $c_{A_0}$  bzw. der Konzentrationsverlauf der Substanz A und die Herleitung hierzu sind in Gleichung 2.20 und 2.21 dargestellt. Gleichung 2.21 erhält man durch Integration von Gleichung 2.20.

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = k_1 \cdot c_A \quad (2.20)$$

$$c_A = c_{A_0} \cdot e^{-k_1 t} \quad (2.21)$$

Die Geschwindigkeit  $v$  der Reaktion ist definiert als Konzentrationsveränderung der Substanz A  $c_A$  in Abhängigkeit von der Reaktionszeit  $t$ . Durch Einführung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  kann die Proportionalität der Konzentration von A zur Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  dargestellt werden. Es entsteht das Zwischenprodukt B mit der Konzentration  $c_B$ . Der Konzentrationsverlauf von B ist in Gleichung 2.22 dargestellt, wobei eine Weiterreaktion zu C nach Gleichung 2.18 bzw. 2.19 angenommen wird.

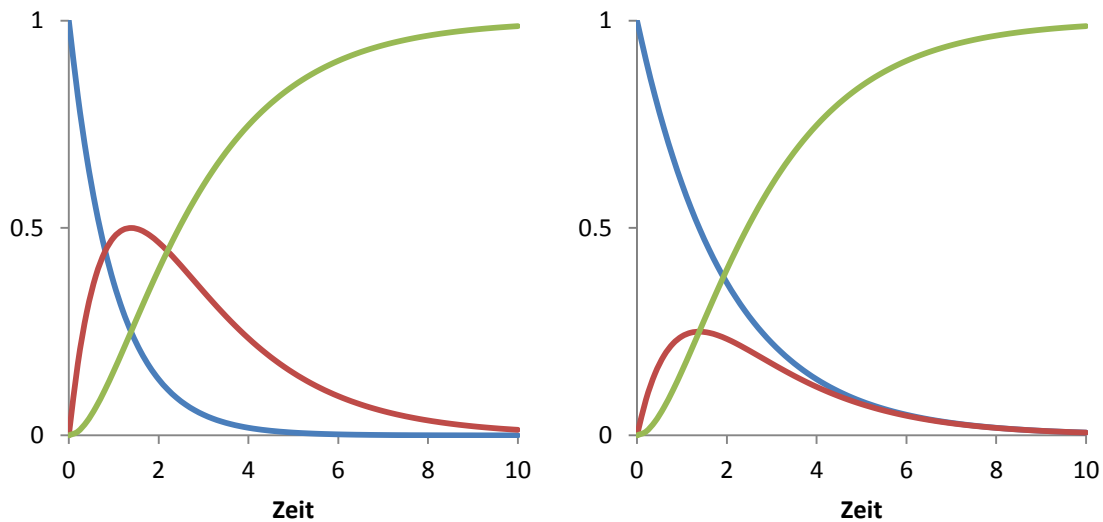
$$c_B = c_{A_0} \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (2.22)$$

Gleichungen 2.21 und 2.22 gelten für Folge- und Folge-Folge-Reaktion<sup>48,96,136,137</sup>.

Handelt es sich um eine Folgereaktion so ist C mit der Konzentration  $c_C$  das Endprodukt und es gilt Gleichung 2.23<sup>136,137</sup>.

$$c_C = c_{A_0} \cdot \left(1 - \frac{k_2}{k_2 - k_1} \cdot e^{-k_1 t}\right) + \left(\frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot e^{-k_2 t}\right) \quad (2.23)$$

Abbildung 2.15 demonstriert die unterschiedlichen Fälle  $k_1 > k_2$  und  $k_1 < k_2$  bei einer Folge-Reaktion.



**Abb. 2.15** Konzentrations-Zeit Kurven von Edukt A (blau), Zwischenprodukt B (rot) und Produkt C (grün) einer Folge-Reaktion mit  $k_1=1$  und  $k_2=0.5$  (links) und  $k_1=0.5$  und  $k_2=1$  (rechts). Die Anfangskonzentration  $c_0$  beträgt 1.

Gut ersichtlich ist der sigmoidale Anstieg bei dem gebildeten Endprodukt C, in der Abbildung grün dargestellt. Der Fall, dass die beiden Geschwindigkeitskonstanten denselben Wert haben tritt nicht auf, da sonst der Nenner 0 wird und die Lösung der Gleichungen 2.22 und 2.23 unmöglich wird.

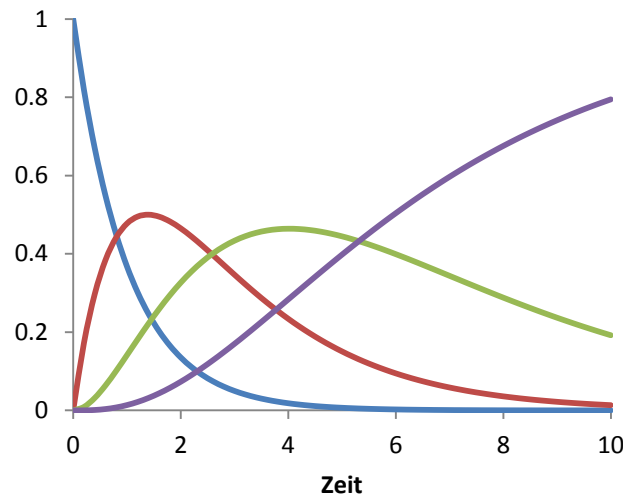
Bei einer Folge-Folge-Reaktion ist C ein zweites Zwischenprodukt, das entsteht und nach einer bestimmten Zeit wieder abnimmt. Das Endprodukt ist D mit der Konzentration  $c_D$ . Es gelten nun Gleichungen 2.24 und 2.25 für C und D<sup>48,96,136,137</sup>.

$$c_C = (c_{A_0} \cdot k_1 \cdot k_2) \cdot \frac{e^{-k_1 t}}{(k_2 - k_1)(k_3 - k_1)} - \frac{e^{-k_2 t}}{(k_2 - k_1)(k_3 - k_2)} + \frac{e^{-k_3 t}}{(k_3 - k_1)(k_3 - k_2)} \quad (2.24)$$

$$c_D = c_{A_0} - \frac{(c_{A_0} \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot e^{-k_1 t})}{(k_2 - k_1)(k_3 - k_1)} + \frac{(c_{A_0} \cdot k_1 \cdot k_3 \cdot e^{-k_2 t})}{(k_2 - k_1)(k_3 - k_2)} - \frac{(c_{A_0} \cdot k_1 \cdot k_2 \cdot e^{-k_3 t})}{(k_3 - k_1)(k_3 - k_2)} \quad (2.25)$$

Abbildung 2.16 zeigt einen Fall der Folge-Folge-Reaktion.





**Abb. 2.16** Beispiel für Konzentrations-Zeit Kurven einer Folge-Folge-Reaktion für Edukt A (blau), Zwischenprodukt B (rot), Zwischenprodukt C (grün) und Produkt D (lila) mit den gewählten Geschwindigkeitskonstanten:  $k_1=1$ ,  $k_2=0.5$  und  $k_3=0.25$ . Die Anfangskonzentration  $c_0$  beträgt 1.

Hierbei sind zwei sigmoidale Anstiege erkennbar: einmal für das Zwischenprodukt C und für das Endprodukt D. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die Bildung einzelner Zwischenprodukte parallel oder nacheinander erfolgen kann, so dass die verwendeten mathematischen Modelle häufig zu anderen Geschwindigkeitskonstanten führen, als aufgrund der Teilreaktion  $A \rightarrow B$  zu erwarten wäre. Es können auch Substanzen, die in der Lösung vorhanden sind oder durch UV-Bestrahlung entstehen, nicht detektiert werden, da die verwendeten spektroskopischen Techniken eine Beobachtung nicht erlauben. Auch können einige Zwischenprodukte bereits zur Zeit  $t=0$  vorhanden sein, zum Beispiel durch Wasserabspaltung von Erythromycin oder Säuredegradation. Dies wird durch Einsatz eines additiven Korrekturfaktors in den Modellen berücksichtigt.

Bei dieser Art der Beschreibung der Kinetik ist die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von der Konzentration der Substanz. Jedoch müssen bei Photoreaktionen noch weitere Parameter berücksichtigt werden: die Strahlungsintensität der Lampe  $I_0$ , die Quantenausbeute der Substanz  $\phi_c$ , die den Anteil der absorbierten Photonen an den von der Lampe emittierten Photonen beschreibt, die Reaktorgeometrie bzw. die Länge des Photoreaktors  $L$ , Anteil des Lichts, das von der Substanz bei einer bestimmten

Wellenlänge absorbiert wird  $f_c$ , siehe Gleichung 2.27, die totale Absorption der Lösung  $A_t$ , siehe Gleichung 2.28, und der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_i$  der  $i$ -ten Substanz. Die Konzentrationsänderung der Substanz A in Abhängigkeit von der Zeit lässt sich nun nach Gleichung 2.26 beschreiben<sup>138,139</sup>.

$$-\frac{dc_A}{dt} = I_0 \phi_c f_c (1 - \exp(-A_t)) \quad (2.26)$$

$$f_c = \frac{\varepsilon_A c_A}{\sum \varepsilon_i c_A} \quad (2.27)$$

$$A_t = 2.303L \sum \varepsilon_i c_{A_i} \quad (2.28)$$

Photoreaktionen verlaufen nach Kinetik nullter oder erster Ordnung, je nachdem wie hoch die Konzentration des Eduktes ist. Wenn Lösungen mit hoher Konzentration an Edukten vorliegen, werden sie nach Kinetik nullter Ordnung beschrieben, bei stark verdünnten Lösungen, wie sie hier in dieser Arbeit verwendet werden, erfolgt die Beschreibung nach Kinetik erster Ordnung<sup>28,39</sup>. Reagiert ein Edukt mit einem OH-Radikal, das bei den Photoreaktionen entsteht, so müsste die Kinetik nach 2. Ordnung beschrieben werden. Da aber die Konzentration der OH-Radikale beim Versuch konstant ist, kann die Geschwindigkeit hier nach pseudo 1. Ordnung beschrieben werden<sup>140–143</sup>. Somit gelten Gleichungen 2.20 und 2.26, die gleichgesetzt werden können, siehe Gleichung 2.29.

$$k_1 \cdot c_A = I_0 \phi_c f_c (1 - \exp(-A_t)) \quad (2.29)$$

Die Quanteneffizienz eines System ist als Anteil der Strahlung zu verstehen, die zu einer Reaktion führt<sup>126</sup>. Bei einer Wellenlänge von 254 nm gilt durch Umformung der Gleichung 2.29 für die Quanteneffizienz Gleichung 2.30<sup>138</sup>.

$$\Phi_{254} = \frac{k}{2.303L\varepsilon_{254}I_{0,254}} \quad (2.30)$$

## 2.5 Anwendung der multivariater Datenanalyse

Seit den 90er Jahren und der Entwicklung moderner Computer wird die Auswertung großer Datenmatrices oftmals mittels multivariater Datenanalyse vorgenommen. Detaillierte mathematische Abhandlungen und Anwendungsbeschreibungen statistischer multivariater und chemometrischer Verfahren finden sich in den Werken von M. Otto, W. Kessler, A.L. Pomerantsev und H. Pruscha<sup>144–147</sup>. In der Wasseranalytik treten neben der hohen Anzahl an Verbindungen in verschiedenen Gewässern, deren Konzentration meist sehr gering ist, auch komplexe Matrices auf, die bei der analytischen Bestimmung der Substanzen häufig ein Problem darstellt<sup>148</sup>. Auch liefern moderne analytische Verfahren eine hohe Anzahl an Rohdaten, die die Auswertung mittels univariater Methoden zusätzlich erschweren. Um dennoch Zusammenhänge zu verstehen, werden multivariate Verfahren eingesetzt. Ziel ist es oftmals, die vorhandenen Daten zu reduzieren und zu visualisieren<sup>144</sup>. Zu den chemometrischen Methoden in der Wasseranalytik zählen: partial least-squares regression (PLS), principal component regression (PCR), principal component analysis (PCA), artificial neural networks, multivariate curve resolution-alternating least-squares und die parallel factor analysis<sup>148</sup>. Unterschieden werden die Methoden nach Qualifizierung bzw. Klassifizierung und Quantifizierung bzw. Regression, aber auch nach Ordnungen je nach Datenmatrix<sup>144,145</sup>.

Zu den Klassifizierungsmethoden zählt die PCA. Diese wird auch in dieser Arbeit zur Visualisierung komplexer Datenmatrices angewendet. Für die Auswertung bzw. Visualisierung mit PCA werden verschiedene Datenmatrices erstellt. Ein Beispiel für eine Datenmatrix  $X$  ist in Abb. 2.17 dargestellt. Hier werden die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten, die bei verschiedenen Versuchsbedingungen erhalten wurden, in den Spalten  $p$  bei unterschiedlichen Substanzen in den Zeilen  $n$  aufgetragen.

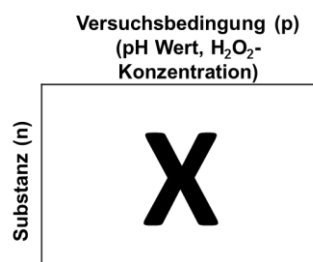


Abb. 2.17 Schematisches Beispiel einer Datenmatrix, die für die PCA verwendet wird

Diese Datenmatrix wird mittels PCA in sogenannte Scores  $T$  oder auch Hauptkomponenten mit  $d$  Spalten und Loadings  $P$  zerlegt, die ebenfalls Matrizen sind. Hinzu kommt noch eine Fehlermatrix  $E$ . Die Matrizenzerlegung ist Abb. 2.18 dargestellt.

$$\begin{array}{c} \text{p} \\ \boxed{\text{X}} \\ \text{n} \end{array} = \begin{array}{c} \text{d} \\ \boxed{\text{T}} \\ \text{n} \end{array} \begin{array}{c} \text{p} \\ \boxed{\text{P}^T} \\ \text{d} \end{array} + \begin{array}{c} \text{p} \\ \boxed{\text{E}} \\ \text{n} \end{array}$$

**Abb. 2.18** Zerlegung der Datenmatrix mittels PCA

Die Zerlegung der Datenmatrix ermöglicht die Reduzierung der Daten in die Hauptkomponenten, die im Scores-Plot dargestellt werden können. Meist wird die erste Hauptkomponente (PC1) gegen die zweite Hauptkomponente (PC2) für die Interpretation aufgetragen. Im Loadings-Plot wird der Einfluss der einzelnen Hauptkomponenten dargestellt.

Ein weiteres interessantes Verfahren ist die Quantitative-Struktur-Wirkungs-Beziehung (QSAR – quantitative structure-activity relationship). Dieses Verfahren wendet chemometrische multivariate Verfahren an zur Bestimmung einer quantitativen Beziehung von zum Beispiel pharmakologischer oder biologischer Wirkung eines Moleküls auf Basis der chemischen Struktur. Auch kann hierbei anhand eines vorhandenen Datensatzes bekannter Toxizitäten die Toxizität von ähnlichen oder neuen Substanzen oder auch die biologische Abbaurate von Pharmazeutika vorhergesagt werden<sup>149–153</sup>. Auch eine Vorhersage anderer Eigenschaften, wie zum Beispiel Siedepunkte, ist mit diesem Verfahren möglich<sup>154</sup>. Ähnlich anderen multivariaten Methoden werden ein Klassifikationsmodell und ein Validierungsset benötigt. Experimentelle Ergebnisse werden mit der chemischen Struktur in Beziehung gebracht und daraus ein Klassifikationsmodell erstellt. Klassifikationsmodelle werden nach bekannten Methoden, wie PLS oder Entscheidungsbäumen erstellt. Das Klassifikationsset besteht in der Regel aus einer gewissen Anzahl an Daten, die aus experimentellen Versuchen erhalten wurden, genauso wie das Validierungsset. Jedoch ist die Anzahl der Daten im Klassifikationsset höher als im Validierungsset. Mit dem Klassifikationsset wird ein Modell für die Vorhersage von Eigenschaften erstellt. Die Güte des Modells

wird anhand des Validierungssets getestet, indem die vorhergesagten Daten aus dem Validierungsset mit den experimentellen, bekannten Daten aus dem Validierungsset verglichen werden. Je besser die Vorhersage, desto besser das Modell. Die Güte eines Modells wird anhand des residual squared errors (RMSE) oder des RMSE-CV, d.h. nach cross-validation bestimmt. Die Güte der Vorhersage wird auf Basis des RMSE des Validierungssets, i.e. RMSE-P beschrieben. QSAR-Analysen werden im Bereich Risikomanagement eingesetzt, zum Beispiel schlägt die Europäische Union vor QSAR-Analysen im Bereich REACH-Verordnungen einzusetzen. Allerdings ist die Zuverlässigkeit von QSAR-Prognosen noch nicht vollständig geklärt<sup>155</sup>.

## 2.6 Verwendete Organismen für ökotoxikologische Untersuchungen

Für die ökotoxikologischen Untersuchungen in dieser Arbeit werden Organismen verwendet um zu überprüfen, ob die Produkte, die durch UV-Bestrahlung entstehen, einen negativen Einfluss auf die Umwelt haben können. Für diese Beurteilung wurde die QSAR-Analyse verwendet. Des Weiteren wird nach Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) recherchiert und mit im Rahmen dieser Arbeit experimentell an zwei Mikroorganismenspezies bestimmten MHK-Werten der Antibiotika verglichen.

Mikroorganismen lassen sich in zwei Spezies unterteilen: gram-positive und gram-negative. Zu den gram-positiven Mikroorganismen zählen *Staphylokokken* und *Bacilli*, zu den gram-negativen Mikroorganismen zählen *Pseudomonaden* und *Enterobakterien*<sup>156</sup>. In dieser Studie werden die Minimalen Hemmkonzentrationen gegen zwei Mikroorganismen bestimmt und analysiert: *Pseudomonas fluorescens* und *Bacillus subtilis*. Beide Mikroorganismen haben unterschiedliche Eigenschaften, die nachfolgend vorgestellt werden.

*Pseudomonaden* gehören zu der Gattung gram-negativer Stäbchenbakterien mit einer Größe von  $0,5\text{--}1\times 1\text{--}4\text{ }\mu\text{m}$  und sind weit verbreitet in Boden, Wasser, auf Pflanzen und Nahrungsmitteln. *Pseudomonas fluorescens* findet sich am häufigsten in Gewässern und eignet sich daher hervorragend zu Ökotoxizitätsuntersuchungen in Gewässern. Aber auch auf Fleischoberflächen, in Milch, Rahm, Butter oder auf Eierschalen können diese

Mikroorganismen vorkommen. In Kläranlagen werden *Pseudomonas*-Arten im Belebtschlamm zum Abbau von Fetten, Ölen und wasserlöslichen Farben eingesetzt<sup>157</sup>.

*Bacillus subtilis* ist ein stäbchenförmiges gram-positives Bakterium. Auch dieses Bakterium wird in Kläranlagen eingesetzt, unter anderem als Denitrifizierungsbakterium<sup>157</sup>. Dieser Mikroorganismus wird in Böden und Gewässern gefunden<sup>158</sup>. Somit eignet sich auch dieses Bakterium für die Analyse bzw. Abschätzung von Ökotoxizität.

In Tabelle 2.5 wird zusammengefasst, welche Antibiotika gegen gram-positive bzw. gram-negative Mikroorganismen aktiv sind. Auch wird gezeigt, ob die Substanz bakteriostatisch, also wachstumshemmend, oder bakterizid, d. h. bakterientötend, wirkt und nach welchem Mechanismus die Antibiotika wirken.

**Tab. 2.5 Aktivität, Wirkung und Wirkmechanismus der verwendeten Antibiotika**

Wirkstoff	Aktivität		Wirkung		Wirkmechanismus	Referenz
	gram-positiv	gram-negativ	bakteriostatisch	bakterizid		
<b>Ciprofloxacin</b>	X	X		X	Hemmung der bakteriellen Topoisomerase II (DNA-Gyrase), Topoisomerase IV	63,64
<b>Enoxacin</b>	X	X		X		63,64,159
<b>Levofloxacin</b>	X	X		X		63,64
<b>Lomefloxacin</b>	X	X		X		63,64
<b>Norfloxacin</b>	X	X		X		63,64
<b>Azithromycin</b>	X	X	X	X	Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese	63,64
<b>Erythromycin</b>	X	X	X	X		63,64
<b>Spiramycin</b>	X <sup>1</sup>		X	X		63,64
<b>Tylosin</b>	X	X	X	X		63,64
<b>Sulfadiazin</b>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X		antibakteriell, antiparasitär	63,159
<b>Sulfamethazin</b>		X <sup>1</sup>	X			63,159
<b>Sulfamethoxazol</b>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X	X		63,159
<b>Sulfathiazol</b>	X	X	X			63,159,160
<b>Doxycyclin</b>	X	X	X		Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese	63,64,156
<b>Oxytetracyclin</b>	X	X	X			63,64,156
<b>Tetracyclin</b>			X			63,64,156

1: Sicherheitsdatenblatt

X: zutreffend;

Leerzeichen: nicht zutreffend

Die meisten untersuchten Wirkstoffe sind gegen gram-positive und gram-negative Mikroorganismen aktiv. Für alle vier untersuchten Sulfonamide und Spiramycin konnten keine Angaben in der Literatur gefunden werden. Die untersuchten Fluorchinolone wirken bakterizid, Makrolide sowohl bakteriostatisch als auch bakterizid und Tetracycline bakteriostatisch. Für Sulfathiazol konnten keine Daten in der Literatur gefunden werden. Sulfadiazin und Sulfamethazin wirken bakteriostatisch und Sulfamethoxazol bakteriostatisch und bakterizid.

Mit Hilfe der MHK-Werte und der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  eines Abbaubversuches, kann bestimmt werden, nach welcher Zeit  $t_{akt}$  die Wirksamkeit eines Antibiotikums gegen den untersuchten Mikroorganismus nachlässt, siehe Gleichung 2.31<sup>96</sup>.

$$t_{akt} = -\frac{\ln\left(\frac{MHK}{c_0}\right)}{k_1} \quad (2.31)$$

Für die QSAR-Analyse wurden Daten, die aus Untersuchungen an *Daphnia magna* (Großer Wasserfloh), Fathead Minnow (Fettköpfige Elritze), *Actinopterygii* (Strahlenflosser, Knochenfisch) und *Branchiopoda* (Armfüßler)- Stämme eingesetzt. Die Organismen leben in Gewässern und eignen sich daher besonders gut für QSAR-Analysen zur Ökotoxizität. Als Richtwert für die Toxizität wird die letale Konzentration  $LC_{50}$ , bei der die Hälfte der Organismen nach einer gewissen Zeit noch lebt, genommen.

## 3 Experimentelle Grundlagen

### 3.1 Chemikalien

Für die photoinduzierten Degradationsversuche wurden Ciprofloxacin (98%, BioChemica AppliChem, Darmstadt, Deutschland), Enoxacin (98%, Alfa Aesar, Lancashire, United Kingdom), Levofloxacin (98%, Alfa Aesar, Lancashire, United Kingdom), Lomefloxacin-Hydrochlorid (98%, Molekula, München, Deutschland), Norfloxacin ( $\geq$  98%, Fluka; Seelze, Deutschland), Azithromycin-Dihydrat (98%, Alfa Aesar, Lancashire, United Kingdom), Erythromycin (BioChemica AppliChem, Darmstadt, Deutschland), Spiramycin (90%, Alfa Aesar, Lancashire, United Kingdom), Tylosin-Tartrat (95%, Alfa Aesar, Lancashire, United Kingdom), Sulfamethoxazole (98%, Fluka, Seelze, Deutschland), Sulfamethazin (99%, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland), Sulfadiazin ( $\geq$ 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), Sulfathiazol (99%, Alfa Aesar, Lancashire, United Kingdom) und Tetracyclin-Hydrochlorid (BioChemica AppliChem, Darmstadt, Deutschland), Doxycyclin-Hyclate ( $\geq$ 98%, Cayman Chemical Company, Michigan, USA) und Oxytetracyclin-Hydrochlorid ( $>$ 99%, Cayman Chemical Company, Michigan, USA) in MilliQ-Wasser (Millipore System Simplicity 185) gelöst. Ciprofloxacin und Azithromycin lösten sich durch Zugabe von HCl in MilliQ-Wasser.

Die Einstellung des pH-Wertes wurde durch Zugabe von Salzsäure (30% HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) bzw. ammoniakalischer Lösung (ca. 25%, Riedel de Haen, Seelze, Deutschland) vorgenommen. Für die Experimente unter Zugabe von Wasserstoffperoxid wurde eine 30%ige stabilisierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung der Firma Roth (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) benutzt. Die Versuche mit Titandioxid wurden mit zwei verschiedenen TiO<sub>2</sub>-Modifikationen durchgeführt, einmal einer Modifikation, bestehend aus einer Mischung aus Brookit, Rutil und Anatas (EMSURE®, Merck, Darmstadt, Deutschland) und einmal P25 Aeroxide® (Arcos Organics, Geel, Belgien).

Die vier Makrolide Azithromycin (Azi), Erythromycin (Ery), Spiramycin (Spi) und Tylosin (Tyl) sind jeweils Mischungen, da Makrolide durch genetisch veränderte Organismen hergestellt werden. Die Substanzen in der Mischung werden dann chemisch



modifiziert<sup>161</sup>. Azithromycin besteht aus Azithromycin A (Azi A) und Azithromycin B (Azi B); Erythromycin aus Erythromycin A (Ery A), Erythromycin B (Ery B) und Erythromycin F (Ery F), Tylosin besteht ebenfalls aus Tylosin A (Tyl A) und Tylosin B (Tyl B) und Spiramycin aus Spiramycin I (Spi I) und Spiramycin III (Spi III).

Für die Ferrioxalat-Aktinometrie wurden folgende Chemikalien verwendet: Schwefelsäure (95%, VWR, Leuven, Belgien), Natriumacetat (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 1,10-Phenanthrolin Hydrochlorid Monohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland), Eisen(III)chlorid Hexahydrat (EMSURE® ACS, Reag. Ph. Eur. zur Analyse, Merck, Darmstadt, Deutschland), *di*-Kaliumoxalat Monohydrat (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und Eisen(II)chlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten).

### 3.2 Analyse von Gewässerproben

Um abzuschätzen, welche Pharmazeutika in heimischen Gewässern vorkommen, wurden über die Literaturrecherche hinaus Gewässerproben analysiert. Dazu wurden Wasserproben aus dem Rinderbach, in dem Wasser aus einem Kläranlagenablauf eingeleitet wird, untersucht. Weitere Wasserproben aus dem Ablauf einer Kläranlage wurden von der Entsorgungsgesellschaft Krefeld erhalten. Diese wurden in Hinblick auf Anwesenheit von umweltgefährdenden Substanzen untersucht. Zunächst wurde der pH-Wert bestimmt. Die Wasserproben im Ablauf hatten einen pH-Wert von ca. 8. Grobe Verschmutzungen der Wasserprobe aus dem Ablauf konnten mit einem Blaubandfilter beseitigt werden.

Der Rinderbach ist ein Nebenfluss der Ruhr, der in Velbert entspringt. Auf seinem Weg in die Ruhr passiert er eine Kläranlage, dessen Ablauf in dem Bach eingeleitet wird. Diese Kläranlage ist mit den bekannten Verfahren der mechanischen, biologischen und chemischen Reinigungsstufen ausgestattet. Sie liegt in der Nähe eines Krankenhauses. Ziel dieser Teilstudie ist der Nachweis von Pharmazeutika, wie Antibiotika, Schmerz- und Blutdruckmittel, nach dem Einleiten in den Rinderbach, bevor das Klärwasser in den Abtskücher Teich gelangt und somit Gefahren für die dort heimischen Tiere, wie zum Beispiel Schildkröten und Biberratten, darstellen könnte.

Um auch die Unterschiede durch saisonale Bedingungen zu untersuchen, wurden innerhalb eines Jahres an neun Tagen Wasserproben als Stichproben nach der Einleitung des Kläranlagenablaufes entnommen (siehe Abb. 3.1). Diese Wasserproben wurden mittels Festphasenextraktion vorbereitet und anschließend mit HPLC-Elektrosprayionisation(ESI)-MS analysiert.



**Abb. 3.1** Probenahme Rinderbach nach dem Einleiten des Kläranlagenablaufes

Außerdem wurden Testversuche an den Oberflächenwasserproben in einem Photoreaktor durchgeführt, um Vorhersagen bezüglich der Effektivität des Abbaus mit Hilfe von UV-Licht zu machen. Hierzu wurde eine UVC-Lichtquelle verwendet.

Des Weiteren wurden Wasserproben aus dem Krefelder Klärwerk (EGK Entsorgungsgesellschaft Krefeld GmbH & Co. KG) untersucht. Hierbei wurden auch photoinduzierte Degradationsversuche durchgeführt, siehe Kap. 3.4.

### **3.2.1 SPE-Methode für die Gewässerproben**

Mittels Festphasenextraktion (SPE) wurde 1 L einer filtrierten Wasserprobe auf 1 mL eingengt. Dabei wurde die SPE-Kartusche Oasis HLB (Waters, Milford, USA) zunächst mit 5 ml Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) konditioniert, mit 5 mL MilliQ-Wasser äquilibriert, mit 1 L Wasser beladen, mit 5 ml Wasser gewaschen und anschließend mit 5 mL Methanol eluiert. Die in Methanol gelösten Substanzen wurden mit dem Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und anschließend mit 1 mL

MilliQ-Wasser wieder aufgenommen. Die Probe wurde mit einem Spritzenfilter gereinigt und dann in das HPLC-MS-System überführt.

### **3.2.2 HPLC-ESI-MS Untersuchungen der Wasserproben**

Die mit SPE aufbereiteten Proben wurden mit einer HPLC (Agilent1100) gekoppelt mit einem Ion-Trap-Massenspektrometer (Thermo Finnigan LXQ) gemessen. Als Eluenten wurden MilliQ-Wasser (Eluent A) und Methanol (Eluent B) eingesetzt. Beide Eluenten waren mit 0.1% Ameisensäure (98-100% Merck, Darmstadt, Deutschland) angesäuert. Als Säule wurde eine Reversed Phase Säule Polaris 3-Amide C-18, 150 mm x 2.00 mm, 3 µm (Agilent, Santa Clara, USA) eingesetzt. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Die chromatographische Trennung wurde mittels Gradient erreicht: 0 bis 2 min 5 % Eluent B, bis 30 min auf 95 % erhöht, bis 35 min bei 95 % gehalten, bis 36 min auf 5 % herabgesetzt und bis 50 min auf 5 % gehalten. Der Fluss betrug 0.3 mL/min. Als Detektor für UV aktive Substanzen diente ein Dioden Array Detektor (DAD).

Das verwendete Massenspektrometer besaß eine Elektrospray-Ionisation (ESI)-Quelle. Die Detektion erfolgte im positiven Modus. Der Gasfluss betrug 15 L/min, die Kapillartemperatur 300 °C und die Kapillarspannung 47 V. Es wurde im Fullscan-Modus über einen Massenbereich von 100 bis 1000 m/z gemessen. Für die Identifizierung der gefundenen Substanzen wurde zudem der Auto-MS<sup>n</sup>-Modus verwendet, der bei einer bestimmten Intensität eines Massensignals, die Masse automatisch fragmentiert.

Das HPLC-ESI-MS-System wurde mit der Software XCalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gesteuert. Die Spektrenauswertung wurde mit derselben Software durchgeführt.

### 3.3 Nachweis und Identifizierung der Pharmazeutika in Modellwässern

Je nach Verfügbarkeit wurden zwei verschiedene HPLC-MS Systeme zum Nachweis und zur Identifizierung der Pharmazeutika und ihrer Phototransformationsprodukte verwendet. Zum einen wurde eine HPLC (Agilent1100) gekoppelt mit einer ESI-IT-MS (Thermo Finnigan LXQ) verwendet, zum anderen eine HPLC (Agilent 1200) gekoppelt mit einem ESI-qTOF-MS (Agilent 6530).

Die Ergebnisse beider HPLC-MS Systeme sind vergleichbar, da normierte Werte wie  $c/c_0$  oder relative Werte verwendet wurden, so dass Unterschiede von den Ionisierungseffizienzen beider Systeme vernachlässigt werden kann.

#### 3.3.1 Nachweismethode unter Verwendung eines HPLC-ESI-Q-TOF-MS

Mit dem HPLC-Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer System wurden hauptsächlich die Makrolide analysiert. Hierzu wurde eine Reversed-Phase C-18 CoreShell Säule (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) verwendet mit einer Dimension von 50 mm x 2.1 mm und einer Partikelgröße von 2.6  $\mu\text{m}$ . Die Säulentemperatur wurde auf 40 °C und der Fluss 0.3 mL/min eingestellt. Als Eluenten wurden Wasser mit 0.1 % Ameisensäure (Eluent A) und Methanol mit 0.1 % Ameisensäure (Eluent B) verwendet. Das Gradientenprogram war wie folgt: 0-1 min 1-30 % B, 30-75 % B innerhalb der nächsten 10 min, 75 bis 99 % B bis 11.1 min, für 0.1 min auf 99 % gehalten und anschließend innerhalb von 0.8 min auf die Ausgangskonzentration zurück gesetzt.

Das Massenspektrometer war mit einer Jet-Stream-Elektrospray-Ionenquelle (ESI) ausgestattet, die im positiven Detektionsmodus betrieben wurde. Der Kollisionsgasfluss betrug 8 L/min, die Gastemperatur 300 °C und die Fragmentierungsspannung 175 V. Der detektierte Massenbereich  $m/z$  wurde von 100 bis 1000 eingestellt.

Das Massenspektrometer und das HPLC-System wurden mit Hilfe der Software MassHunter Workstation B.06.00 gesteuert. Die resultierenden Chromatogramme und Massenspektren wurden mit der gleichen Software ausgewertet.

### **3.3.2 Nachweismethode unter Verwendung eines HPLC-ESI-IT-MS**

Alle weiteren Pharmazeutika wurden mit dem HPLC-Elektrospray-Ion-Trap-MS System analysiert. Für die Fluorchinolone, Sulfonamide und Tetracycline wurde eine Reversed-Phase Säule Polaris 3-Amide C-18, 150 mm x 2.00 mm, 3  $\mu$ m (Agilent) eingesetzt. Die Säulentemperatur betrug 40 °C.

Für die Analyse der Fluorchinonlone wurde eine isokratische Methode verwendet. Das Eluentenverhältnis betrug 90 % Wasser und 10 % Methanol. Beide Eluenten wurden mit jeweils 0.1% Ameisensäure versetzt. Für die Analyse der Makrolide wurde die gleiche Methode angewendet wie die bei dem HPLC-ESI-Q-TOF-MS verwendeten. Bei den Sulfonamiden wurde ebenfalls eine isokratische Methode verwendet. Dabei wurde eine Zusammensetzung von 80 % MilliQ-Wasser und 20 % Methanol eingesetzt. Beide Eluenten wurden mit 0.1 % Ameisensäure angesäuert.

Bei den Tetracyclinen wurde auch isokratisch chromatographiert. Für Tetracyclin und Oxytetracyclin wurde ein Eluentengemisch mit 90 % H<sub>2</sub>O und 10 Acetonitril, für Doxycyclin mit 75% H<sub>2</sub>O und 25% Acetonitril verwendet. Wieder wurden beide Eluenten mit 0.1% Ameisensäure versetzt.

Das verwendete Massenspektrometer besaß eine ESI-Quelle, die im positiven Detektionsmodus betrieben wurde. Der Gasfluss betrug 15 L/min, die Kapillartemperatur 300 °C und die Kapillarspannung 47 V. Es wurde im Fullscan-Modus über einen Massenbereich von 100 bis 1000 m/z gemessen. Für die Identifizierung der ermittelten Substanzen wurde zudem der Auto-MS<sup>n</sup>-Modus verwendet.

Das HPLC-ESI-MS-System wurde mit der Software XCalibur 2.0 gesteuert. Die Chromatogramme und Spektren wurden mit derselben Software ausgewertet.

### 3.3.3 Bestimmung der Absorbanz mittels UV/Vis-Spektroskopie

Es wurden UV/Vis-Spektren der Pharmazeutika mit einem UV-Vis Spektrometer (UV-1601PC, Shimadzu Europa, Duisburg, Deutschland) aufgenommen. Für die UV/Vis-Spektrenaufnahme und die daraus resultierende Bestimmung der Extinktionskoeffizienten wurde jedes Antibiotikum in MilliQ-Wasser gelöst. Die Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  bei einer bestimmten Wellenlänge wurden nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz, siehe Gleichung 3.1 bestimmt.

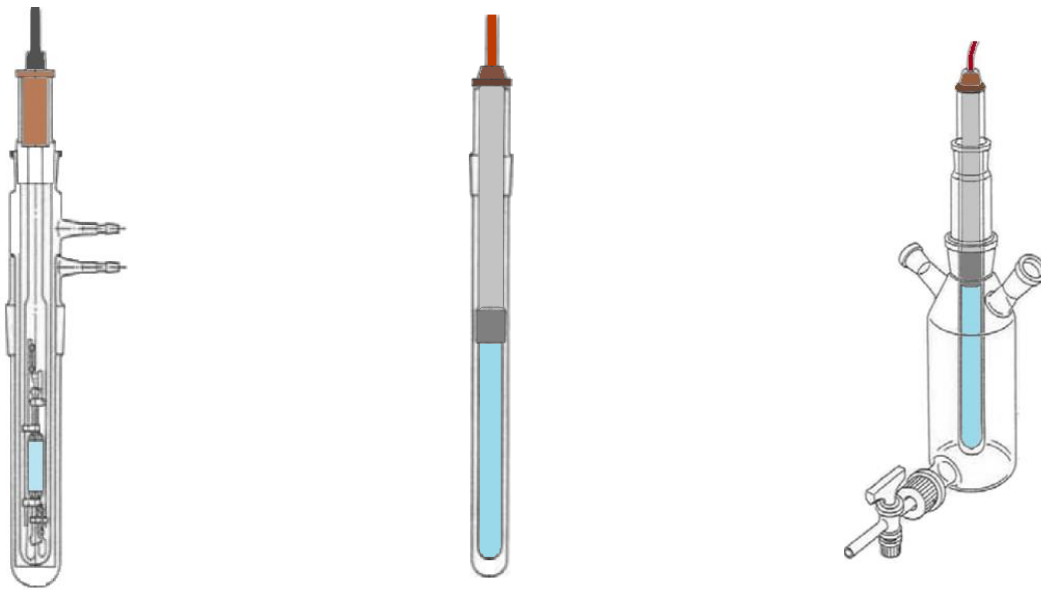
$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3.1)$$

Die pH-Werte 3, 6 und 9 wurden durch Zugabe von Salzsäure bzw. ammoniakalischer Lösung eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in eine Quarz-Küvette von 1 cm Schichtdicke  $d$  transferiert und gemessen. Je nach Signalintensität im Absorptionsspektrum wurde die Konzentrationen  $c$  der Antibiotika variiert. Als Referenzprobe diente eine mit MilliQ-Wasser gefüllte Quarz-Küvette.

## 3.4 Photoinduzierte Abbauversuche

### 3.4.1 Aufbau der Versuchsanlage

Photoinduzierte Abbauversuche wurden in einem 1 L-Batch-Reaktor (Peschl Ultraviolet GmbH) durchgeführt. Für die Bestrahlung wurden zwei verschiedene Lichtquellen eingesetzt; eine UVA-Lampe, die Quecksilber-Mitteldruck-Lampe (Heraeus, TQ 150, 150 W), die wegen der Leistung und damit verbundenen Temperaturentwicklung mit einer Kühlung betrieben wurde, und eine UVC-Lampe, die Quecksilber-Niederdruck-Lampe (Heraeus TNN 15/32, 15 W), die ohne Kühlung auskam, siehe Abb. 3.2.



**Abb. 3.2** UVA-Lampe mit Kühlung (links), UVC-Lampe (mitte) und Photoreaktor (rechts)

Der Reaktor wurde mit 750 mL Lösung bei der Variante mit UVA-Lampe oder mit 800 mL Lösung bei UVC-Lampen-Einsatz befüllt. Die Konzentration des jeweiligen Wirkstoffs betrug 20 mg/L in MilliQ-Wasser. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Salzsäure bzw. ammoniakalischer Lösung eingestellt. Jede Lösung wurde 10 min mit UVA-oder UVC-Licht bestrahlt. Beide UV-Lampen wurden zentrisch in dem Reaktor eingesetzt, siehe Abb. 3.2. Für eine gute Durchmischung im Reaktor wurde ein Magnetrührer (500 Umdrehungen/min) eingesetzt. Die Reaktionstemperatur im gesamten Reaktor betrug  $22 \pm 2$  °C und wurde während des Abbaus mit Hilfe eines Thermometers überprüft. Proben mit einem Volumen von 2 mL wurden in 30 s Intervallen aus dem Reaktor entnommen und nach 5 min Bestrahlungszeit in Minuten-Intervallen. Die Gesamtbestrahlungszeit betrug 10 min.

### 3.4.2 Einsatz photokatalytischer Substanzen

Der photokatalytische Abbau von Antibiotika wurde mit Wasserstoffperoxid und mit Titandioxid durchgeführt. Für die photokatalytischen Untersuchungen mit Wasserstoffperoxid wurde zu den Antibiotikallösungen Wasserstoffperoxid hinzugegeben, so dass Konzentrationen von 10 mg/L und 30 mg/L in dem Gemisch vorlagen. Die

Konzentration wurde mit Merckoquant Teststäbchen vor und nach einem Bestrahlungsversuch bestimmt. Hierbei zeigten sich gleiche Werte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  konstant blieb. Obwohl sich Wasserstoffperoxid in OH-Radikale spalten, wurde keine signifikante Verringerung der Wasserstoffperoxidkonzentration beobachtet.

Als weiterer Katalysator diente Titandioxid. Auch dies wurde vor dem Bestrahlungsversuch zur Antibiotikalösung hinzugegeben. Die Konzentrationen betrugen 50 mg/L und 100 mg/L Titandioxid. Bevor die Lösung mit UV-Licht bestrahlt wurde, wurde die Lösung in dem Reaktor mit dem Magnetrührer umgerührt, so dass eine milchige Lösung vorlag. Diese milchige Lösung wurde dann mit dem UV-Licht bestrahlt. Auch während des Versuches wurde die Lösung mit 500 Umdrehungen/min mit dem Magnetrührer gerührt, so dass die Strahlen der UV-Lampe im ganzen Reaktor trotz Trübung wirken können.

### **3.4.3 Einfluss von Sauerstoff**

Neben der Photokatalyse wurde auch der Einfluss von Sauerstoff untersucht. In dem verwendeten MilliQ-Wasser waren ca. 7 bis 8 mg/L Sauerstoff vorhanden. Die Sauerstoffkonzentration wurde mit einem Oximeter (Mettler Toledo, SevenGo pro) überprüft. Um Sauerstoff aus der Antibiotikalösung zu entfernen, wurde die Lösung so lange mit Stickstoff durchspült, bis kein Sauerstoff mehr vorhanden war. Die Spülzeit der Lösung betrug etwa 15 min. Stickstoff wurde mit Hilfe eines Generators (Atlas Copco SF 4 FF) erzeugt.

### **3.4.4 Photodegradationsversuche mit Wasserproben aus dem Kläranlagenablauf**

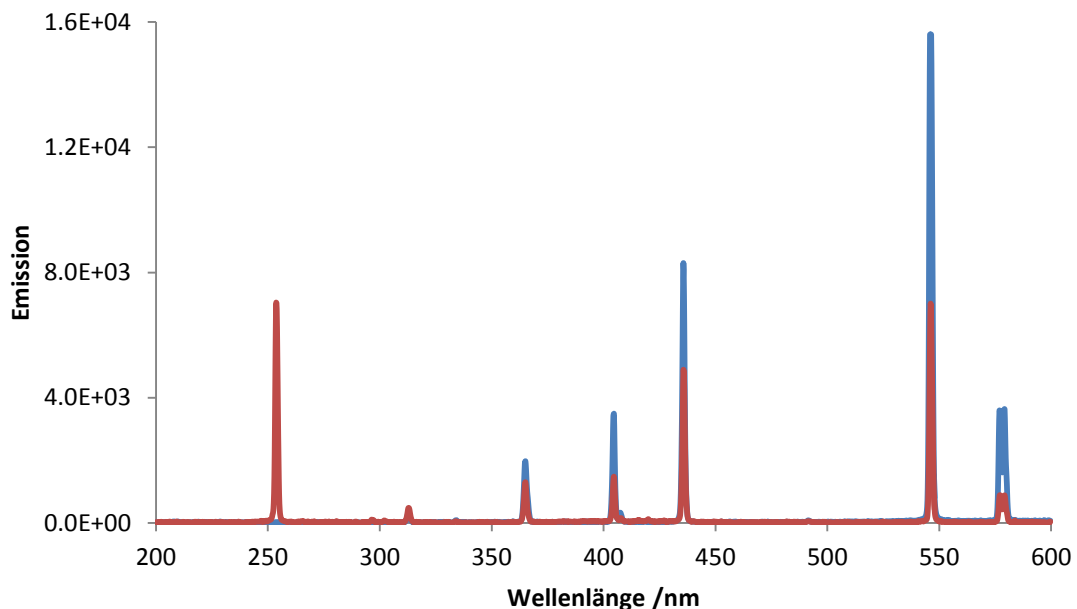
Bis jetzt wurden die Versuche in MilliQ-Wasser beschrieben. Um nun die Matrixeffekte in Wasserproben zu untersuchen wurden zusätzlich Photodegradationsversuche mit Ablaufwasser aus der Kläranlage Krefeld unter den oben beschriebenen Parametereinstellungen durchgeführt. Der pH-Wert der Ablaufproben betrug 7-8. Zusätzlich wurden die Abwasserproben mit einem Antibiotikum versetzt, so dass eine



Anfangskonzentration von 20 mg/L vorlag. Diese Konzentration wurde gewählt, um, obwohl in Gewässern die Konzentrationen der Substanzen deutlich geringer sind, die Resultate mit denen der MilliQ-Wasserlösungen zu vergleichen und eine Produktidentifizierung zu ermöglichen.

### 3.4.5 Charakteristika der verwendeten UV-Lampen

Für alle durchgeführten Degradationsexperimente ist die Bestrahlungsquelle entscheidend für den Erfolg einer Degradation. Deshalb wurden die Charakteristika beider Lampen untersucht. Abb. 3.3 zeigt die unterschiedlichen Emissionsspektren beider Lampen.



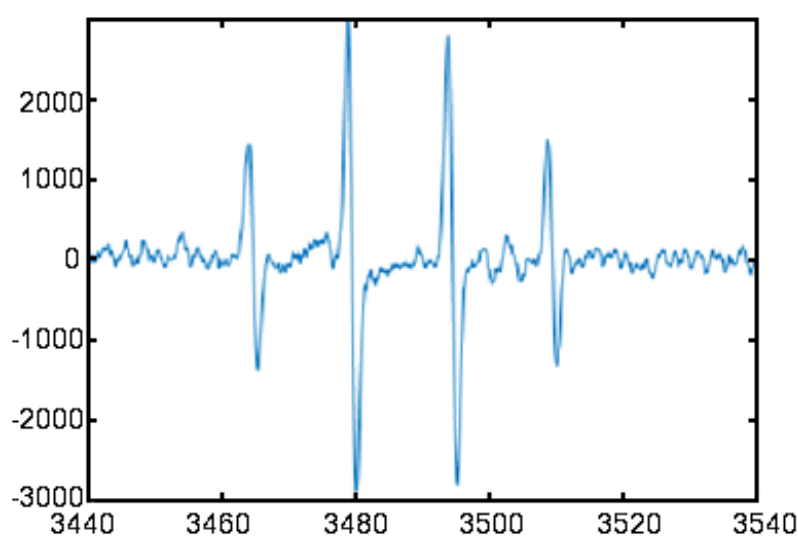
**Abb. 3.3** Emissionsspektren der UVA-Lampe (blau) und der UVC-Lampe (rot)

Die Emissionsspektren wurden nach einer halben Minute Bestrahlung aufgenommen. Durch Integration der Peaks wurde der prozentuale Anteil der Strahlung bei der entsprechenden Wellenlänge berechnet. Beide Lampen emittierten polychromatisches Licht, deren maximale Strahlungsintensitäten bei den Wellenlängen 313, 365, 405, 437, 547, 578 und 580 nm vorzufinden waren. Der prozentuale Anteil der emittierten Strahlung ist in Tab. 3.1 dargestellt.

**Tab. 3.1** Prozentualer Anteil der emittierten Strahlung beider UV-Lampen

Wellenlänge /nm	Prozentualer Anteil (UVA-Lampe)	Prozentualer Anteil (UVC-Lampe)
253.73	0	25.43
313.31	0.58	2.98
365.46	5.92	4.46
405.25	7.94	7.34
436.56	19.57	20.10
546.89	47.75	24.44
577.60	8.69	7.64
579.85	9.55	7.61

Die UVC-Lampe emittierte zusätzlich bei 185 nm und bei 254 nm. Da das zur Aufnahme der Emissionsspektren verwendete Spektrometer HR4000 (Ocean Optics, Duiven, Niederlande) nicht in der Lage war, Wellenlängen unterhalb von 200 nm aufzunehmen, wurde als indirekter Beweis für die Emission von 185 nm ein ESR-Experiment durchgeführt, in dem MilliQ-Wasser mit 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DMPO) versetzt und mit der UVC-Lampe bestrahlt wurde. Unterhalb von 200 nm wird Wasser zu OH-Radikalen gespalten. Diese reagierten mit DMPO zu DMPO-OH. Das stabilisierte Radikal war dann im ESR-Spektrum sichtbar, siehe Abb. 3.4<sup>126,131,132</sup>. Das Signal mit Kopplungsmuster entspricht dem in Kap. 2.3.4 beschriebenen Erwartungswert.

**Abb. 3.4** ESR-Spektrum von DMPO-OH in wässriger Lösung von DMPO nach 2 min Bestrahlung mit UVC-Licht

Der Gesamtfluss der Photonen im Wellenlängenbereich zwischen 200 und 500 nm wurde mit Hilfe von Ferrioxalat-Aktinometrie nach IUPAC bestimmt<sup>162,163</sup>. Er betrug  $3.50 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  bei der UVA-Lampe und  $2.03 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  bei der UVC-Lampe.

Für die Ferrioxalat-Aktinometrie wurde eine Aktinometer-Lösung, bestehend aus  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$ , MilliQ-Wasser und Schwefelsäure, eine Pufferlösung, bestehend aus Natriumacetat und Schwefelsäure, und eine Phenanthroliniumchlorid-Lösung ( $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) hergestellt. Um die Aktinometer-Lösung herzustellen, wurden di-Kaliumoxalat-Monohydrat und Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, zusammen in Wasser gegeben, so dass eine Reaktion zwischen diesen beiden Substanzen stattfand und  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$  entstehen konnte. Die Konzentration der Aktinometrie-Lösungen (Eisen(III)<sup>+</sup>-Ionen) betrug 12 mmol/L. Der Versuchsreaktor wurde mit der Aktinometrie-Lösung befüllt und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Die in der Aktinometrie-Lösung enthaltene Eisen(III)-Ionen wurden zu Eisen(II)-Ionen reduziert. Das entstehende zweiwertige Eisen reagierte mit 1,10-Phenanthrolin zu einem rötlichen Komplex, der photochemisch mit einem UV/Vis-Spektrometer (UV-1601PC, Shimadzu Europa, Duisburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 508 \text{ nm}$  detektiert wurde.

Nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer wurden 1 mL Proben entnommen, mit Pufferlösung und Phenanthroliniumchlorid-Lösung versetzt und auf 100 mL MilliQ-Wasser verdünnt. Nach einer Wartezeit von einer Stunde bildete sich  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$ , das dann mittels UV/Vis-Spektrometer detektiert wurde. Auffällig war, dass die maximale Strahlungsintensität der UVA-Lampe nach 2 min erreicht wurde. Da es nicht möglich war, die Lampe nach einer Aufwärmzeit in den Reaktor einzusetzen, wurde die Beobachtung der Kinetik eines Degradationsversuches erst nach 2 min Bestrahlung begonnen. Bei der UVC-Lampe war sofort die maximale Strahlungsintensität erreicht, so dass sich hier direkt von Beginn an der Verlauf der Konzentration-Zeit Kurven beobachten ließ.

### 3.5 Kinetik-Fit der Photodegradationsversuche

Alle beobachteten Konzentrations-Zeit Kurven wurden numerisch mit Hilfe des Curve-Fitting-Tool von MatLab R2014b bis R2016b (MathWorks©) durchgeführt. Die Fits entsprechen den jeweiligen Gleichungen 2.21-2.24 aus Kap 2.4. Kurven-Fits für die Endprodukte wurden nicht verwendet, da keine Endprodukte beobachtet wurden bzw. die Produkte, die entstanden wieder abgebaut wurden, also Zwischenprodukte darstellen.

### 3.6 Bestimmung der MHK

Die Minimalen Hemmkonzentrationen gegen zwei Mikroorganismen wurden nach ISO 20776-1:2007 bestimmt<sup>164</sup>. Die Mikroorganismen waren der gram-negative *Pseudomonas fluorescens* (DSMZ-Nr. 50090) und der gram-positive *Bacillus subtilis* (DSMZ-Nr. 10). Eine 96-Well-Platte, die bereits die 100 µL Organismen enthielt, wurde für eine Dreifachbestimmung der MHKs mit 100 µL Nährmedium mit  $10^6$  koloniebildenden Einheiten, bestehend aus 8 g/L Nutrient Broth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany) mit 2 % Agar-Agar (BioScience, granuliert, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) befüllt. Hinzu kam dann das jeweilige Antibiotikum mit unterschiedlichen Anfangskonzentrationen in einer geometrischen Verdünnungsreihe. Danach wurde die Platte für 24 h bei 30 °C für *Pseudomonas fluorescens* und bei 35 °C für *Bacillus subtilis* inkubiert. Die optische Dichte wurde stündlich in einem Zeitraum von einem Tag mit drei verschiedenen Mikroplatten-Reader bestimmt. Die Wellenlänge der jeweiligen Plattenreader betrugen 595 nm, 600 nm und 620 nm. Die Verwendung verschiedener Mikroplatten-Reader hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse, erlaubte lediglich paralleles und daher schnelleres Arbeiten.

### **3.7 Multivariate Datenanalyse**

Multivariate Datenanalysen wurden mit Hilfe von MatLab Versionen R2014b bis R2016b durchgeführt. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde sowohl mit PLS\_Toolbox (Eigenvector Research, Washington, USA) als auch mit direkten MatLab Routinen durchgeführt.

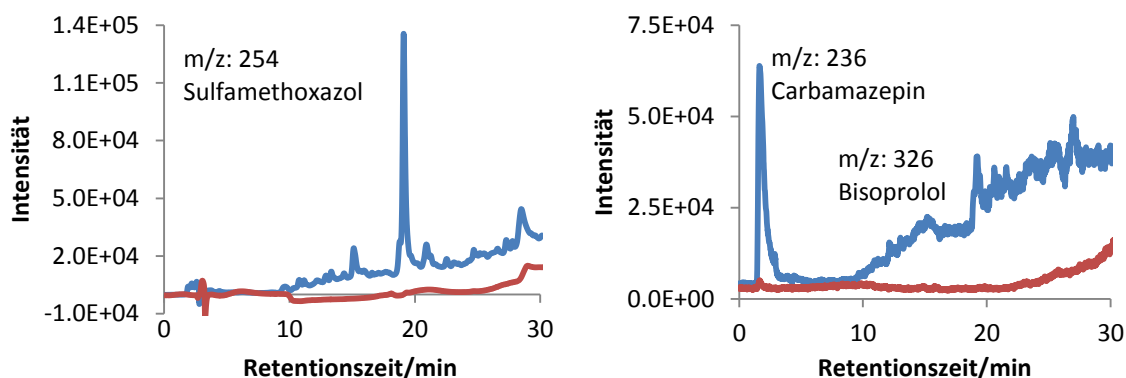
Datenanalyse in Form von QSAR erfolgte mittels T.E.S.T (Toxicity Estimation Software Tool) Version 4.2.1 (Environmental Protection Agency of the United States, Sustainable Technology Division National Risk Management Research Laboratory, Cincinnati, Ohio, US) und mit der Software OECD QSAR Toolbox 3.4.0.17 vom Labor für Mathematische Chemie, Universität Bourgas, Bulgarien (OASIS Laboratory of Mathematical Chemistry, 2012). Hierzu wurden die Strukturen mit ChemSketch 2016.1.1 (ACD/Labs, Toronto, Ontario, Canada) oder MarvinSketch 16.3.21 (ChemAxon, Budapest, Ungarn) gezeichnet und als .sdf oder .mol-File exportiert.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Analyse von Gewässerproben

Ziel dieser Studie ist, herauszufinden, welche Pharmazeutika in den heimischen Gewässern vorkommen. Die Untersuchung erfolgte innerhalb eines Jahrs, um saisonale Unterschiede zu analysieren. Des Weiteren war interessant, ob und wie fern die angewendete Methode, die standardmäßig durchgeführt wird, auch in dieser Studie verwendbar war.

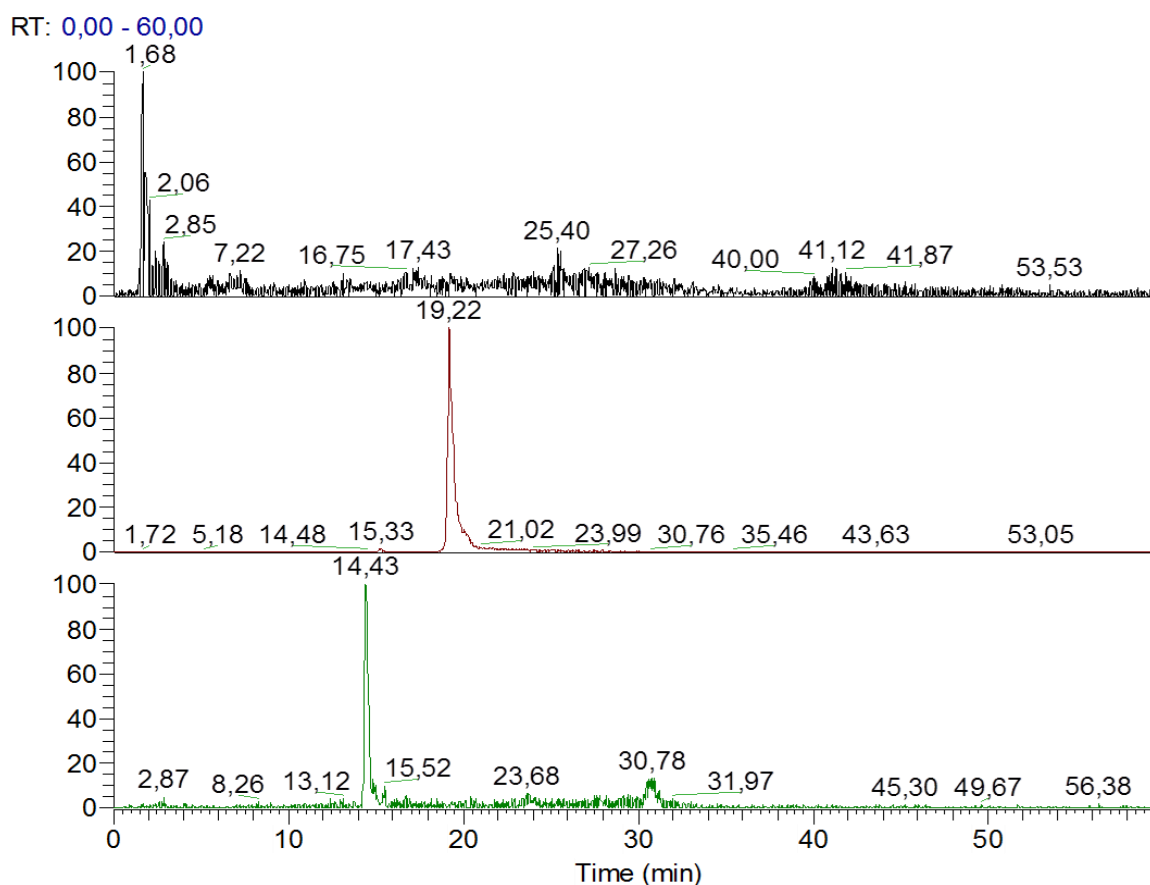
Nachdem die Proben mittels der SPE-Methode, die in Kap 3.2.1 beschrieben wurde, aufbereitet wurden, wurden die Proben mittels HPLC-MS analysiert. Für die Identifizierung der Pharmazeutika wurden zunächst die erhaltenen Chromatogramme analysiert. Mittels Dioden-Array-Detektor (DAD) konnte ein Chromatogramm erzeugt werden, in dem UV-aktive Substanzen detektiert wurden. Die Ionen wurden mittels Massespektrometer bzw.  $MS^n$ -Techniken analysiert. Um system- bzw. methodenbedingte Druckunterschiede und Verunreinigungen ausschließen zu können, wurde als Referenzprobe MilliQ-Wasser verwendet. Die Chromatogramme sind in Abb. 4.1 dargestellt.



**Abb. 4.1** Dioden-Array-Detektor (DAD) Chromatogramm (links) und Total Ion Chromatogramm (TIC) (rechts) der HPLC-ESI-IT-MS-Analyse der Gewässerprobe RB1 aus dem Bach (blau) im Vergleich zu MilliQ-Wasser (rot), (Ausschnitte).

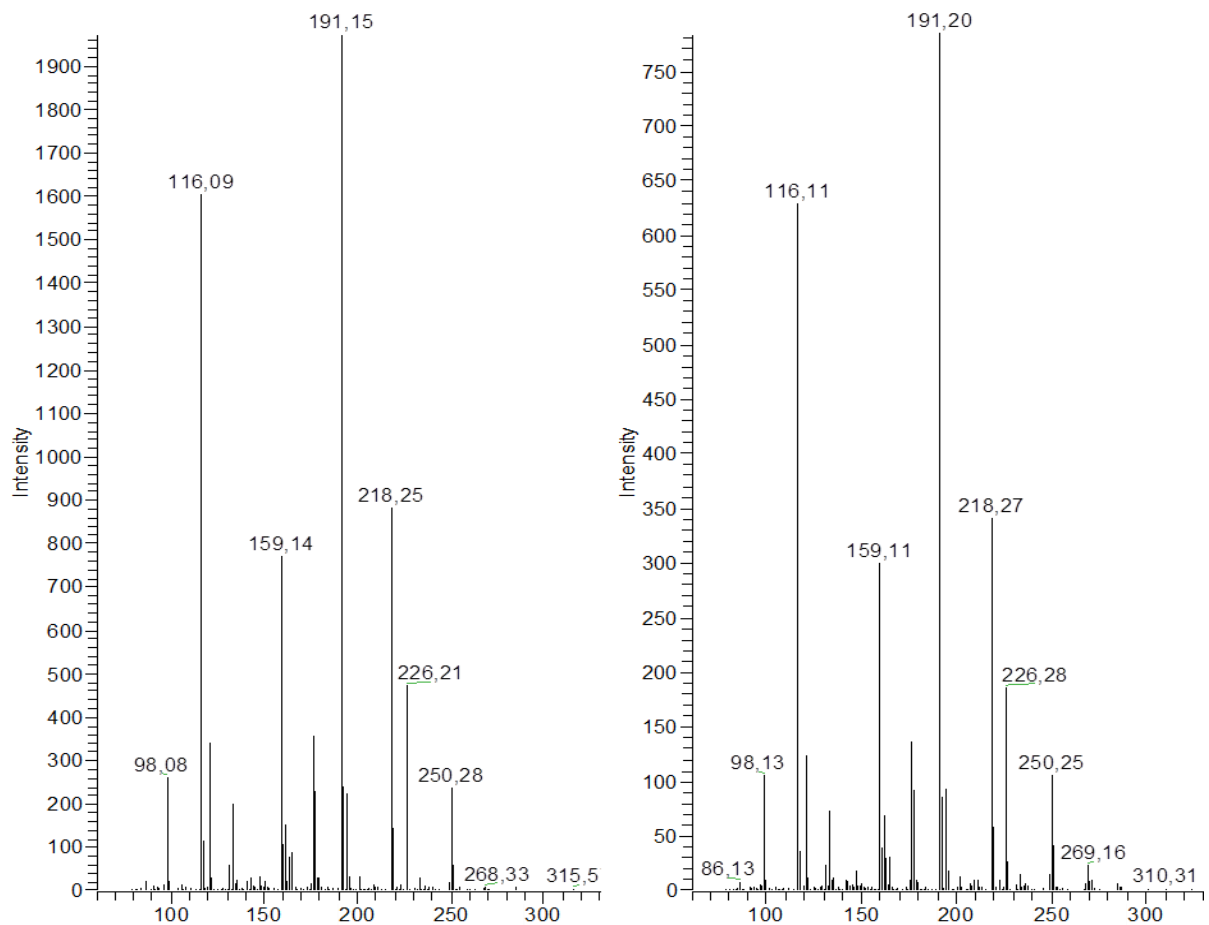
Gut beobachtbar mit dem DAD waren ein Peak bei einer Retentionszeit von 19 min und ein Peak mit dem MS bei 2 min. Des Weiteren waren noch weitere intensitätsschwächere Peaks sichtbar. Mittels MS wurden nun die beobachteten Massen analysiert, siehe Abb. 4.1. Der Vergleich mit der Referenzprobe zeigt, dass in dem System Druckänderungen vorherrschen und die Basislinie ansteigt. Dies ist typisch bei Verwendung eines Gradienten und hat keinen Einfluss auf die qualitative Auswertung.

Um eindeutigere Retentionszeiten zu erhalten bzw. herauszufinden, wann die vermuteten Pharmazeutika im Chromatogramm erscheinen, wurden Extracted Ion Chromatogramme (EIC) zu dem vermuteten Pharmazeutika generiert, siehe Abb. 4.2.



**Abb. 4.2** EICs von Carbamazepin  $m/z = 236$  (schwarz), Sulfamethoxazol mit  $m/z = 254$  (rot) und Bisoprolol  $m/z = 326$  (grün).

Mittels  $MS^n$ -Techniken wurden die Ionen fragmentiert, um eine eindeutige Identifizierung der Substanzen zu gewährleisten, und mit Standards als Referenzprobe verglichen. In Abb. 4.3 ist Metoprolol als Beispiel dargestellt.



**Abb. 4.3** MS/MS Spektrum zu den Ionen  $m/z = 268$  nach chromatographischer Trennung der Rinderbachprobe (links) und Metoprolol (5 mg/L) in wässriger Lösung (rechts)

Es wurden unter anderem die Fragmente  $m/z$  250; 226; 218; 191; 159; 116 beobachtet, die den für Metoprolol in der Literatur beschriebenen Fragmenten entsprechen<sup>75,165</sup>. Es kann davon ausgegangen werden, dass Metoprolol in der untersuchten Wasserprobe vorhanden war. Analog wurde für die Identifizierung weitere Pharmazeutika vorgegangen. In Tabelle 4.1 sind weitere auf diese Weise im Rinderbach identifizierte Substanzen dargestellt.



**Tab. 4.1** Übersicht über die in den Proben aus dem Rinderbach identifizierten Substanzen sowie deren Nachweis in Abhängigkeit vom Probenahme-Tag

Probennahme	25. Jan. 2015	11. Feb. 2015	1. Mrz. 2015	6. Apr. 2015	25. Mai. 2015	26. Jul. 2015	27. Sep. 2015	06. Dez. 2015	17. Jan. 2016
Azithromycin	X						X		
Bisoprolol	X		X	X	X	X	X	X	X
Carbamazepin	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ciprofloxacin	X							X	X
Clarithromycin	X								
Clenbuterol						X	X		
Doxycyclin					X			X	
Ibuprofen		X				X			X
Ketoprofen						X	X		
Metoprolol	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Propranolol						X			
Salbutamol					X				
Sotalol		X				X		X	
Sulfamethoxazol	X	X	X						
Tramadol	X				X	X	X	X	X

In fast jeder Probe wurden die beiden  $\beta$ -Blocker Bisoprolol und Metoprolol, sowie das Antiepileptikum Carbamazepin gefunden. Sulfamethoxazol wurde nur im ersten Quartal 2015 gefunden. In dieser Zeit herrschte deutschlandweit eine starke Grippewelle, was den Fund dieses Antibiotikumserklärt<sup>166</sup>. Deutlich weniger häufig gefunden wurden die Antibiotika Azithromycin, Ciprofloxacin, Clarithromycin und Doxycyclin, die Antiasthmatica Clenbuterol und Salbutamol, die Entzündungshemmer Ibuprofen und Ketoprofen, die  $\beta$ -Blocker Propranolol und Sotalol. Das Antidepressivum Tramadol wurde zwischen Mai und Dezember in jeder Gewässerprobe gefunden. Wechselnde An- bzw. Abwesenheit von Substanzen können auch wetterbedingte Hintergründe haben. Durch Regen wird die Konzentration der Substanzen im Oberflächenwasser erniedrigt. Bei Sonnenschein könnten die Substanzen bereits abgebaut werden. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wasserproben Pharmazeutika enthalten und dass die angewendete Methode zum Nachweis der Substanzen in natürlichen Wässern geeignet ist.

## **4.2 Allgemeine Versuche zur Photodegradation**

In diesem Kapitel werden Versuche durchgeführt, die für die Beurteilung der Abbauprozesse relevant sind. Zunächst wurden die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Antibiotika bei drei verschiedenen pH-Werten bestimmt, um daraus die Quanteneffizienzen nach Gleichung 2.30 bestimmen zu können.

Für die Beschreibung der aufgenommenen Konzentrations-Zeit Kurven wurden verschiedene Modelle getestet. Welches Modell am besten zu den Konzentrations-Zeit Kurven passt, wird in Kap. 4.2.2 beschrieben. Um auszuschließen, dass ein Abbau ohne Bestrahlung erfolgt, wurden Dunkelversuche durchgeführt. In diesem Kapitel wird dazu ein Beispiel dargestellt.

Die MHK-Bestimmung wurde ebenfalls für die in dieser Arbeit untersuchten Antibiotika durchgeführt, um die Wirksamkeit gegen in den Umweltkompartimenten vorhandene gram-positive und gram-negative Bakterien als Maß für mögliche Ökotoxizität abschätzen zu können. Diese MHK-Bestimmung dient als Vergleich für spätere Versuche, in dem die MHK-Werte während eines Abbauprozesses bestimmt werden.

### 4.2.1 Zusammensetzung der untersuchten Makrolidantibiotika

Das Verhältnis und die Art der in einer wässrigen Lösung von Erythromycin nachgewiesenen Spezies sind abhängig vom pH-Wert. Bei den pH Werten 3, 7 und 9 konnten Erythromycin A und Erythromycin B mittels LC-ESI-Q-TOF-MS detektiert werden. Erythromycin F wurde nur bei pH 9 detektiert. Eine Erklärung hierfür ist die Anwesenheit von OH<sup>-</sup>-Ionen bei pH 9, die sich dann an Erythromycin A addieren können. Des Weiteren findet zweimal eine Dehydrierung von Erythromycin A an unterschiedlichen Stellen statt. Eine Übersicht über die vier verschiedenen Makrolid-Mischungen ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

**Tab. 4.2** Identifizierte Makrolide und Spezies in Lösung mit den m/z-Werten ihrer theoretischen und beobachteten quasimolekularen Ionen [M+H]<sup>+</sup> und deren beobachteten Fragmente.

Komponente	R <sub>t</sub> /min	theoretisch [M+H] <sup>+</sup>	beobachtet [M+H] <sup>+</sup>	Fragmente
<b>Azi A</b>	6.4	749.5158	749.5258	591.4215; 375.2667
<b>Azi B</b>	7.0	733.5209	733.5300	575.4329; 367.2689
<b>Ery A</b>	8.0	734.4685	734.4732	576.3794; 558.3669
<b>Ery B</b>	9.4	718.4736	718.4785	542.3717
<b>Ery F</b>	7.0	750.4634	750.4727	591.4244; 453.3453; 375.2631
<b>Ery A-H<sub>2</sub>Oa</b>	9.0	716.4580	716.4619	-
<b>Ery A-H<sub>2</sub>Ob</b>	10.0	716.4580	716.4623	-
<b>SpiI</b>	6.0	843.5213	843.5269	438.2800; 422.2667; 781.5456
<b>SpiIII</b>	6.6	899.5475	899.5485	-
<b>Tyl A</b>	8.7	916.5264	916.5374	742.4372; 582.3637; 336.2019
<b>Tyl B</b>	8.0	772.4478	772.4559	598.3348; 582.3637

### 4.2.2 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten mittels UV/Vis-Spektroskopie

Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren ist für diese Arbeit wichtig um zu sehen, wo die UV-Absorption einer spezifischen Verbindung maximal ist und um Extinktionskoeffizienten und damit Quanteneffizienzen bei den verschiedenen emittierten Wellenlängen der verwendeten Strahlungsquellen, zu bestimmen. Dies gibt einen Hinweis über den Erfolg einer photoinduzierten Degradation. Jedoch kann der Abbau auch auf radikalischen Reaktionen, wie die Reaktion mit OH-Radikalen, basieren. Die Bildung von OH-Radikalen ist ebenfalls photoinduziert, siehe Kap. 2.3.1.

Extinktionskoeffizienten wurden bei 254 nm, 313 nm und 365 nm bestimmt, da diese Wellenlänge von beiden verwendeten UV-Lampen emittiert wurden. Die Makrolidantibiotika sind, wie schon erwähnt, Mischungen. Für die Berechnung der Extinktionskoeffizienten wurde die molare Masse der Hauptsubstanz verwendet, da bei einem Molekulargewicht von 730 Da geringfügige Abweichungen als vernachlässigbar angenommen wurden. Alle ermittelten Extinktionskoeffizienten sind in Tab. 4.3 aufgeführt.

**Tab. 4.3** Extinktionskoeffizienten der Lösungen von 16 Antibiotika bei pH 3, 7 und 9, geordnet nach Antibiotikaklassen.

Substanz	pH	254 nm /L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	313 nm /L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	365 nm /L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	$\lambda$ ( $\epsilon_{\max}$ ) /nm	$\epsilon_{\max}$ /L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
<b>Ciprofloxacin</b>	3	11024	10705	2740	277	32051
	7	10641	10450	2358	277	32115
	9	16307	11175	1689	271	30406
<b>Enoxacin</b>	3	9337	3741	1481	268	16155
	7	13136	5704	874	264	15465
	9	12313	5451	3399	264	15921
<b>Levofloxacin</b>	3	11939	12272	3351	293	31117
	7	12070	9782	2254	292	28641
	9	14432	9684	2362	288	25362
<b>Lomefloxacin</b>	3	11430	12000	2576	287	37624
	7	10046	13119	2081	282	32548
	9	11413	12000	1934	282	32181

<b>Norfloxacin</b>	3	11511	12234	1686	276	42828
	7	7350	7803	1069	276	25970
	9	10606	6974	270	271	22599
<b>Azithromycin<sup>1</sup></b>	3	21	14	-	-	-
	7	14	7	-	-	-
	9	14	7	-	-	-
<b>Erythromycin<sup>2</sup></b>	3	59	33	13	-	-
	7	46	26	13	-	-
	9	40	26	13	-	-
<b>Spiramycin<sup>3</sup></b>	3	12983	3878	2698	232	280562
	7	11055	2903	1898	232	264640
	9	12688	3840	2671	232	278124
<b>Tylosin<sup>4</sup></b>	3	3512	6420	69	292	15983
	7	3868	7373	-	292	18766
	9	3926	7442	-	292	18559
<b>Sulfadiazin</b>	3	15300	1885	100	263	19688
	7	20272	1568	33	255	20339
	9	23592	1201	33	254	23592
<b>Sulfamethazin</b>	3	18086	5212	33	262	20503
	7	18019	4713	22	262	19960
	9	21590	1264	33	257	22122
<b>Sulfamethoxazol</b>	3	9319	191	-	267	13722
	7	14204	90	-	256	14184
	9	13923	100	-	257	14374
<b>Sulfathiazol</b>	3	15542	1827	30	284	19837
	7	18030	873	132	284	20801
	9	16639	1837	10	257	18273
<b>Doxycyclin</b>	3	10577	7235	7271	271	13182
	7	9235	7786	8009	274	11546
	9	13271	4862	11920	263	13573
<b>Oxytetracyclin</b>	3	10022	8715	10460	273	12242
	7	12360	4659	12278	265	14453
	9	11465	5838	12287	274	11584
<b>Tetracyclin</b>	3	12464	12498	15627	356	16570
	7	12275	12747	16159	356	16921
	9	12644	8752	16467	365	16732

<sup>1</sup>molarer Extinktionskoeffizient der Gesamtaborption von **Azi A** und **Azi B**

<sup>2</sup>molarer Extinktionskoeffizient der Gesamtaborption von **Ery A**, **Ery B**, **Ery A- H<sub>2</sub>Oa** und **Ery A - H<sub>2</sub>Ob**

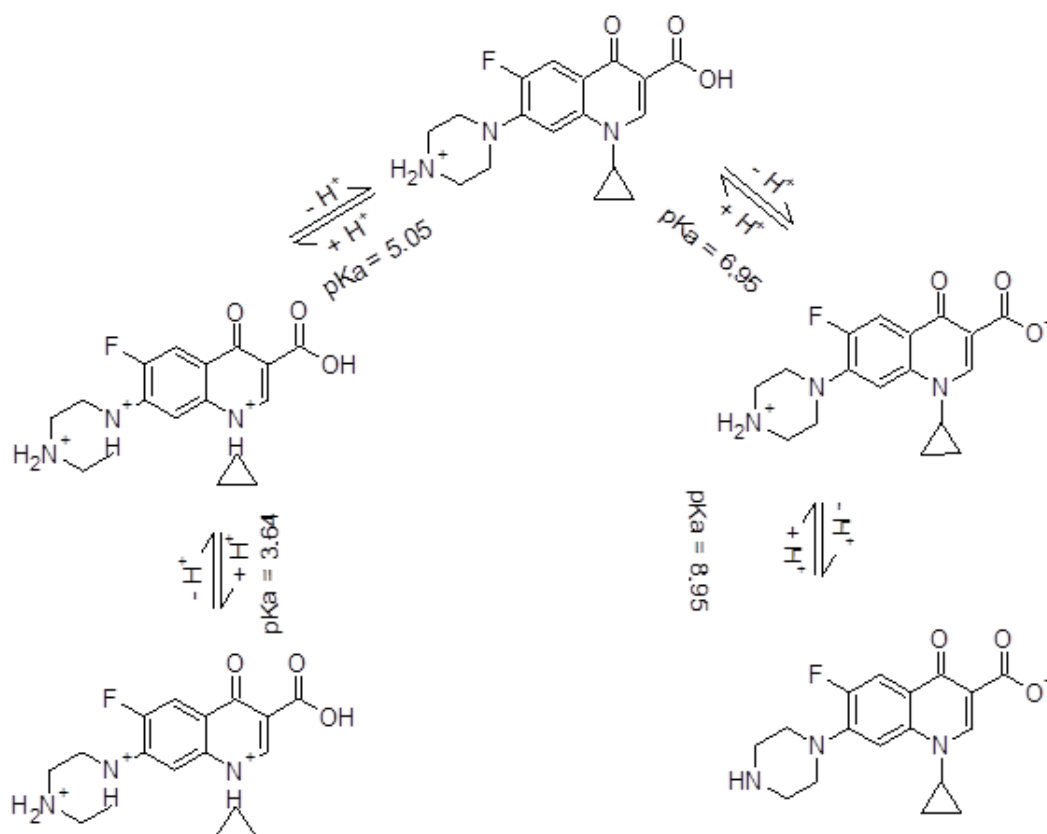
<sup>3</sup>molarer Extinktionskoeffizient der Gesamtaborption von **Spi I** und **Spi III**

<sup>4</sup>molarer Extinktionskoeffizient der Gesamtaborption von **Tyl A** und **Tyl B**

Bei der Betrachtung der Extinktionskoeffizienten der Makrolide fällt auf, dass Azithromycin und Erythromycin deutlich niedrigere Extinktionskoeffizienten besitzen als Spiramycin und Tylosin. Warum diese Eigenschaft interessant für Photodegradationsversuche im Hinblick auf deren Abbau und Produktentstehung ist, wird in Kapitel 4.4 diskutiert.

Sulfonamide haben bei 365 nm und 313 nm im Vergleich zu Fluorchinolonen und Tetracyclinen ebenfalls eine sehr schwache UV-Absorption. Auch dies hatte einen Einfluss auf den photoinduzierten Abbau.

Die Wellenlänge, bei der die maximale Extinktion beobachtet worden ist, variiert bei verschiedenen pH-Werten für eine Substanz. Dies lässt sich auf pH-abhängige Ladungsverschiebung zurückführen. Zum Beispiel ändert sich die Ladung von Ciprofloxacin durch pH-abhängige Protonierung und Deprotonierung, siehe Abb. 4.4.



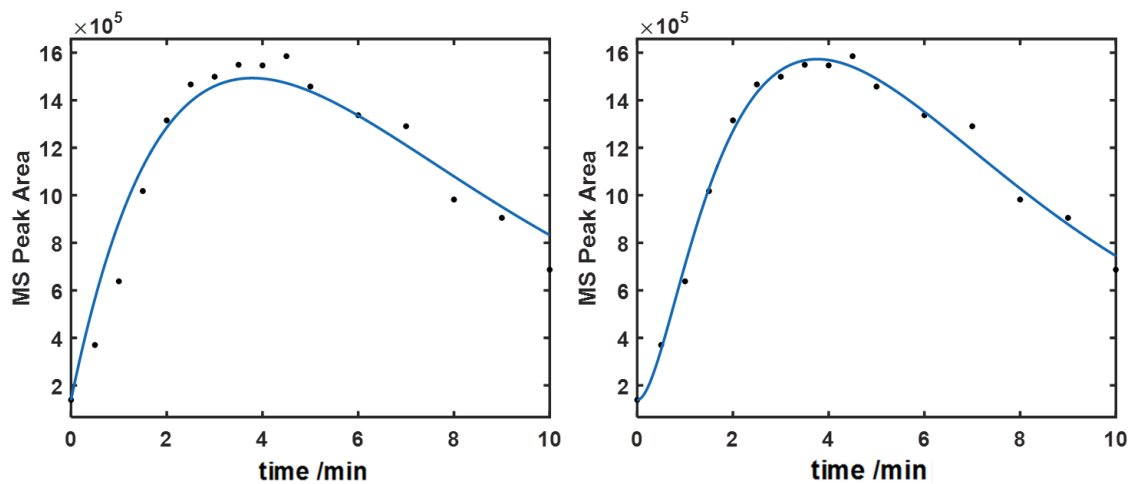
**Abb. 4.4** Einfluss des pH-Wertes auf die Protonierung und Deprotonierung von Ciprofloxacin, in Anlehnung an Salma et al.<sup>167</sup>.

An dem Beispiel wird, deutlich, dass die Photodegradation bei verschiedenen pH-Werten untersucht werden muss, da es zu Tautomerien kommen kann und Einfluss auf den Abbau erwartet wird.

### 4.2.3 Beschreibung der Kinetik unter Verwendung des Curve-Fitting Tool

Mit Hilfe des Curve-Fitting Tool von MatLab wurden die Konzentrations-Zeit Verläufe der Abbauprodukte bzw. Zwischenprodukte gefittet. Nach Gleichung 2.18 und Gleichung 2.19 wird die Hauptsubstanz abgebaut, ein Zwischenprodukt entsteht, woraus wieder neue Produkte entstehen können usw. Praktisch konnten die Degradation der Primärschubstanz nach dem Modell einer Reaktion 1. Ordnung, die Intermediate nach einer Folge- oder einer Folge-Folgereaktion 1. Ordnung beschrieben werden<sup>136</sup>.

Um die Güte einer mathematischen Funktion, d. h. eines Fits, zu beurteilen, wurden die mittlere quadratische Abweichung, RMSE, und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  herangezogen. Ein Beispiel für zwei verschiedene Kurvenanpassungen ist in Abb. 4.2.2.1 dargestellt.



**Abb. 4.5** Konzentrations-Zeit Kurven des Photodegradationsprodukts mit  $m/z = 352$ , das aus 20 mg/L Tylosin, gelöst in MilliQ-Wasser, bei pH 7 durch UVC-Bestrahlung entstand. Links wurde das Produkt nach einer Folgereaktion (Gleichung 2.22) gefittet und rechts nach Folge-Folge-Reaktion (Gleichung 2.24). Die Anpassungen lieferten folgende Qualitätsparameter:  $R^2 = 0.9431$ ,  $RMSE = 1.16e+05$  (links) und  $R^2 = 0.9904$ ,  $RMSE = 4.98e+04$  (rechts).

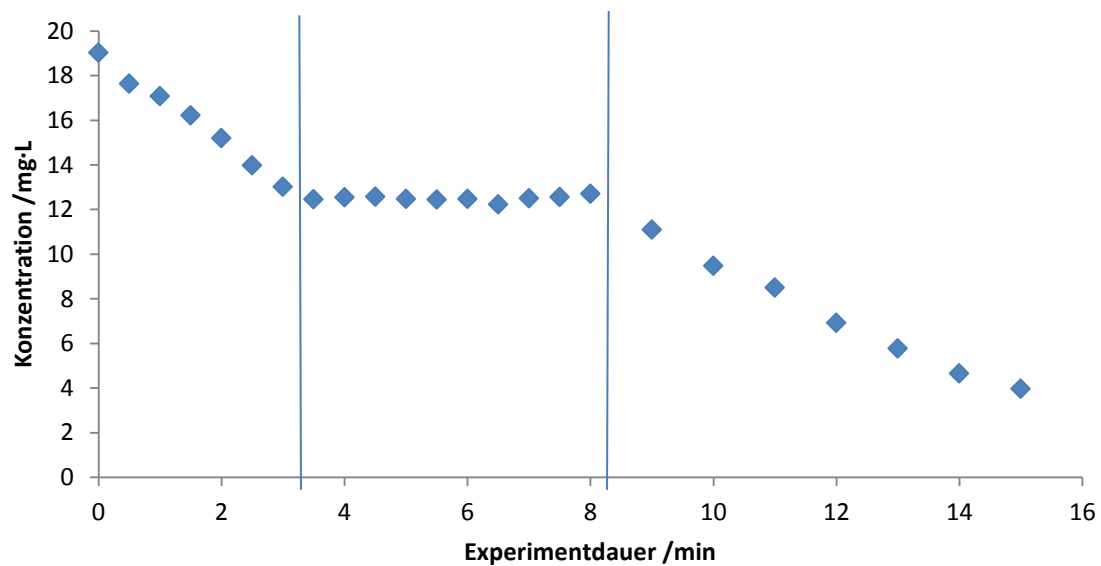
Wie in Abb. 4.5 zu erkennen ist, beschreibt das Modell, das für die Beschreibung der Konzentrations-Zeit Kurve im rechten Teil der Abbildung verwendet wurde, die Messdaten besser. Somit folgt aus dem besseren Fit, dass es sich hier um eine Folge-Folge-Reaktion handelt.

In einigen der durchgeführten Versuche ließ sich der Abbau des Zwischenprodukts nicht bis zur vollständigen Abnahme verfolgen, so dass die zweite bzw. dritte Geschwindigkeitskonstante einer Folge- bzw. Folge-Folge-Reaktion nicht bestimmbar waren. In diesen Fällen lieferte ein Fit entweder keine sinnvollen Werte oder eine zu schlechte Güte, so dass die Werte im Weiteren nicht berichtet wurden.

#### **4.2.4 Dunkelversuch als Kontrollversuch**

Um die Validität der Bestimmung der kinetischen Parameter zu prüfen, wurde das Verhalten der Wirkstoffe mit und ohne UV-Bestrahlung untersucht. Dabei sollte geprüft werden, ob und inwieweit Degradation ohne UV-Exposition berücksichtigt werden müsste. Als Beispiel wird Ciprofloxacin vorgestellt. Bis zu 3.5 min wurde eine Probe von 20 mg/L im Reaktor mit UVC-Licht bestrahlt und alle halbe Minute eine Probe von 2 mL entnommen. Anschließend wurde die Lampe von 3.5 min bis 8 min ausgestellt. Weiterhin wurde alle halbe Minute eine Probe zur Analyse entnommen. Zum Schluss wurde wieder bestrahlt und Proben alle halbe Minuten bis zu einer Gesamtdauer von 15 min entnommen. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe von HPLC-ESI-IT-MS untersucht. Die Resultate sind in Abb. 4.6 dargestellt.





**Abb. 4.6** Verlauf der Konzentrations-Zeit Kurve von Ciprofloxacin bei einem Hell-Dunkel-Versuch in Phasen mit (links), ohne (mitte) und mit (rechts) Bestrahlung

Wie in Abbildung 4.6 zu erkennen ist, fand kein Abbau ohne UVC-Bestrahlung statt. Diese Eigenschaft wurde auch für die anderen Substanzen beobachtet. Jedoch wurde eine pH-abhängige Degradation bei den Makroliden beobachtet. Die Degradationsprodukte befanden sich schon in der Stammlösung, so dass Makrolide während des Lösungsvorgangs degradieren. Hierbei wurde allerdings nur ein sehr langsamer Abbau beobachtet, so dass noch nach einer Woche die Makrolide zu 90% in der Lösung vorhanden waren, wenn sie keiner UV-Bestrahlung ausgesetzt waren. Unter UV-Bestrahlung fand ein deutlich schnellerer Abbau statt, siehe Kap. 4.4.

#### 4.2.5 Bestimmung der MHKs

Für eine Bestimmung der Wirksamkeit gegen gram-positive und gram-negative Bakterien wurden die MHK der hier verwendeten Antibiotika gegen *Pseudomonas fluorescens* und *Bacillus subtilis* bestimmt, siehe Tab. 4.4. Diese Werte wurden auch zur Abschätzung der Ökotoxizität verwendet.

**Tab. 4.4** MHK-Werte der untersuchten Antibiotika gegen die Mikroorganismen *Ps. fluorescens* und *B. subtilis* im Vergleich zu den in der Literatur gefundenen Werten

Wirkstoff	<i>B. subtilis</i> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>E. coli</i> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>Ps. aeruginosa</i> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>Ps. fluorescens</i> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>S. aureus</i> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Referenz
<b>Ciprofloxacin</b>	0.02	0.13	1.00		0.50	168,169
	0.12	0.01	0.25		0.15	170,171
		0.02	0.25		0.12 -	172
					0.50	
		0.12 -			7.68	173
		0.24				
<b>Enoxacin</b>			0.12		0.50	174
	<0.10			<0.10		Diese Studie
	0.13	0.25	4.00		1.00	168,169
	1.00	1.00			1.00	175
		0.25	1.00		0.50	172
<b>Levofloxacin</b>	0.22			0.54		Diese Studie
	3.12	3.12	3.12		3.12	176
	1.52	1.52	1.52		1.52	177
	0.78					178
		1.90	0.39		0.39	175
		0.03	0.50		0.12	174
		0.03	0.50		0.12 -	172
					0.25	
		0.06 -			0.48	173
		0.12				
<b>Lomefloxacin</b>	<0.10			0.20		Diese Studie
					0.50	172
	0.17			0.92		Diese Studie
<b>Norfloxacin</b>	0.06	0.25	4.00		1.00	168,169
		0.06	0.50		1.00	174
		0.06	1.00		0.25 -	172
					1.00	
<b>Azithromycin</b>	0.39			0.42		Diese Studie
					0.12	172
					0.50	174
					0.25	179
	5.90			49.48		Diese Studie

<b>Erythromycin</b>	1 ± 1			0.19	180
		128	64		181
		>100		0.06	179
				≤0-25	182
				0.12 - 0.5	172
				0.25	174
				1.95	183
				2 ± 1	184
	0.21 <sup>a</sup>			96.90	Diese Studie
<b>Spiramycin</b>		120	0		185
				22	184
	7.03			177.75	182
<b>Tylosin</b>	1.26			160.80	Diese Studie
<b>Sulfamethazin</b>	98.01			> 512	Diese Studie
<b>Sulfadiazin</b>	104.50			> 512	186
<b>Sulfamethoxazol</b>	6	>100		25	Diese Studie
	6.40			48.51	187
<b>Sulfadiazol</b>		16		> 512	Diese Studie
	24.26			16	186
<b>Doxycyclin</b>		64	16		174
		2		0.12	181
	0.18			0.71	174
<b>Oxytetracyclin</b>	5.56			1.51	Diese Studie
<b>Tetracylin</b>		64	16		Diese Studie
		2		0.50	181
		1.6		0.9	174
		1-2	32	0.06	179
		7.8	16	0.50	172
				≤1	-
				3.9	188
	2.77			0.64	182
					183
					Diese Studie

Tabelle 4.4 zeigt, dass eine antimikrobielle Wirkung bei den hier untersuchten Fluorchinolonen größtenteils unter  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  vorliegt. Dies liegt oberhalb der gefundenen Konzentrationen in Gewässern. Dennoch können Gefahren für die Umwelt auftreten, wie zum Beispiel Resistenzen der Bakterien, aber auch die regelmäßige Einnahme der Antibiotika kann zur Verweiblichung der in den Gewässern lebenden Fische führen<sup>6–11</sup>. Die ermittelten MHK-Werte für die Fluorchinolone lagen sowohl bei *Ps. fluorescens* als auch bei *B. subtilis* unter  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Dies stimmt gut mit den Literaturwerten für andere gram-positive und gram-negative Mikroorganismen überein.

Makrolide sind gegen gram-positive und gram-negative Bakterien wirksam<sup>156</sup>. Zu Tylosin konnten keine Literaturwerte gefunden werden und bei Azithromycin nur ein Wert. Erythromycin wurde bereits ausführlich gegen die Wirksamkeit von Bakterien untersucht. Hierbei zeigten sich Unterschiede zwischen gram-positiven und gram-negativen Bakterien. Bei den gram-negativen Bakterien konnte allgemein eine niedrigere Hemmkonzentration erreicht werden, als bei den gram-positiven Bakterien. Demnach wirken Makrolide besser gegen gram-negative Bakterien als gegen gram-positive Bakterien. Für Makrolide wurden deutlich höhere MHK-Werte und damit schwächere Wirksamkeit im Vergleich zu Fluorchinolonen gefunden. Gegen *Ps. fluorescens* wurden Werte zwischen  $48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bis  $178 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bestimmt und somit die relative Unwirksamkeit von Makroliden gegenüber gram-negativen Bakterien bestätigt. Gegen gram-positive Bakterien erwiesen sich Makrolide jedoch wie erwartet wirksam.

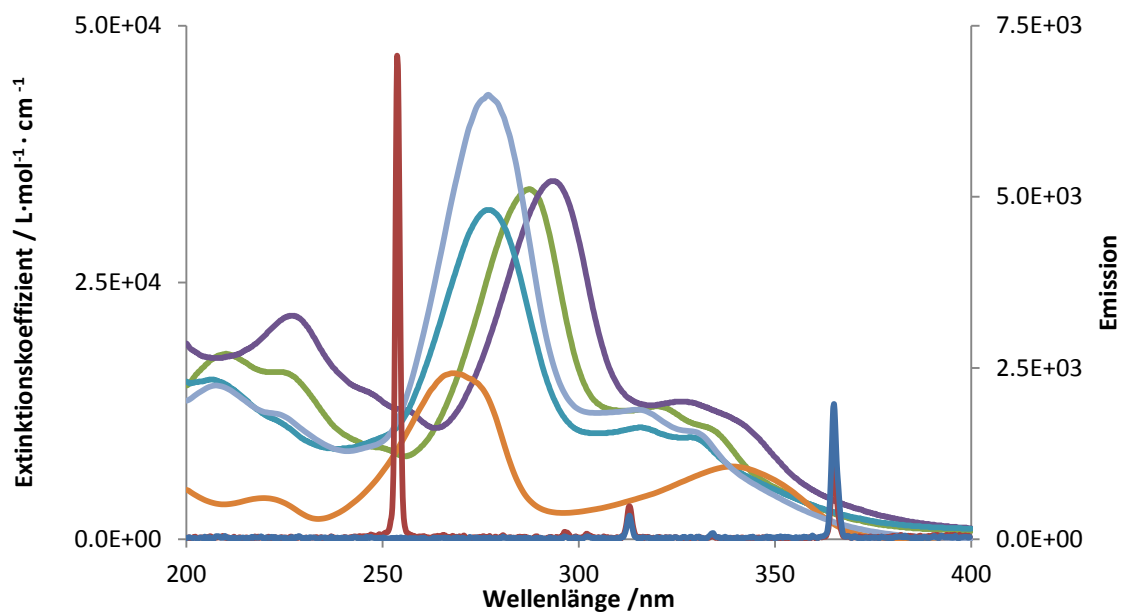
Bei den Sulfonamiden konnte, trotz der langen Anwendungsdauer im klinischen Bereich unerwartet, im Vergleich zu den anderen Antibiotikaklassen, sehr wenig zugängliche Literatur gefunden werden. Dies liegt unter anderem daran, dass die Wirkung der Sulfonamide gegen Mikroorganismen bei Konzentrationen über 500 mg/L auftreten kann<sup>186</sup>. Somit ist eine höhere Dosierung dieser Sulfonamide erforderlich. Für Sulfamethoxazol wurde eine MHK von  $6.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  gegen *B. subtilis* ermittelt. Dieser Wert stimmt genau mit dem auf der Studie von Argyropoulou *et al.* überein<sup>187</sup>. Allgemein konnten hier relativ hohe Hemmkonzentrationen beobachtet werden. Im Vergleich zu den Fluorchinolonen wirken Sulfonamide also nur relativ schwach gegen die untersuchten Bakterienstämme.

Das am häufigsten gegen Mikroorganismen getestete Tetracyclin ist Tetracyclin selbst. Zu Oxytetracyclin konnten keine Werte gefunden werden. Die MHK-Werte für die Tetracycline lagen etwas höher als die der Fluorchinolone, dennoch niedriger als die der Sulfonamide und Makrolide. Die gefundenen Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten gegen andere gram-positive und gram-negative Mikroorganismen.

Die untersuchten Antibiotika lassen sich von wirksam bis unwirksam auflisten: Fluorchinolone, Tetracycline, Makrolide und Sulfonamide.

### 4.3 Fluorchinolone

Bei den Fluorchinolonen wurden zunächst UV-Vis Spektren aufgenommen, um die UV-Aktivität der einzelnen Fluorchinolone abschätzen zu können. Abbildung 4.7 zeigt die daraus resultierenden Extinktionskoeffizienten, sowie die Emissionsspektren der beiden UV-Lampen in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

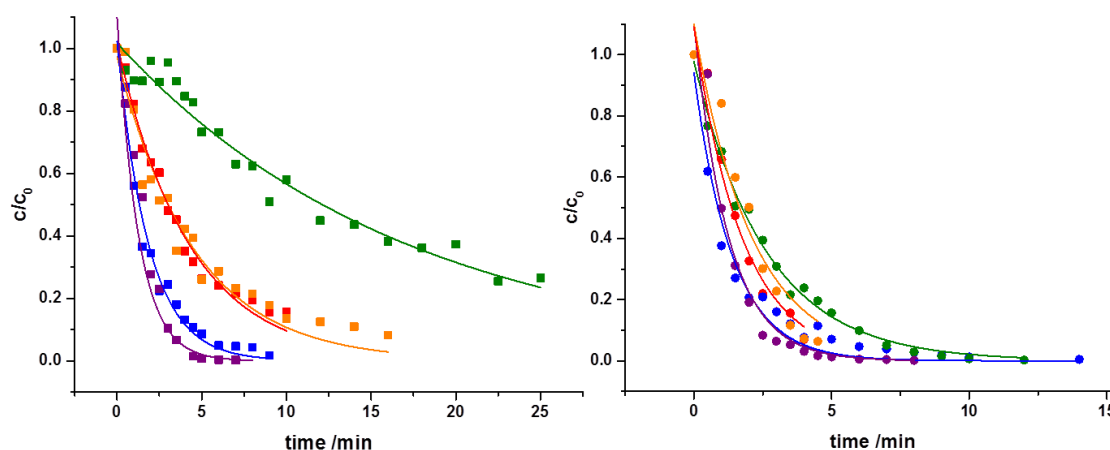


**Abb. 4.7** Dispersion der Extinktionskoeffizienten von Ciprofloxacin (türkis), Enoxacin (orange), Levofloxacin (lila), Lomefloxacin (grün) und Norfloxacin (hellblau) in wässriger Lösung bei pH 3-4 im Vergleich zu den Emissionsspektren von UVA- (blau) und UVC-Lampe (rot).

Alle untersuchten Fluorchinolone zeigen eine signifikante Extinktion bei 254 nm, 313 nm und 365 nm. Somit können die Fluorchinolone sowohl UVA-, als auch UVC-Strahlen absorbieren. Eine UV-Aktivität und damit photoinduzierte Reaktionen werden erwartet.

### 4.3.1 Photoinduzierte Abbauprobversuche und ökotoxikologische Untersuchungen der Abbauprobversuche

Für diese Versuchsreihe wurden die Substanzen 30 min mit beiden Lampen in neutraler Lösung bestrahlt. Der Abbau der Fluorchinolone konnte nach Kinetik 1. Ordnung gefittet werden. Die ermittelten Kurven sind in Abb. 4.8 dargestellt.



**Abb. 4.8** Normierte Konzentrations-Zeit Kurven von Ciprofloxacin (rot), Enoxacin (blau), Levofloxacin (grün), Lomefloxacin (lila) und Norfloxacin (orange) unter UVA- (links) und UVC-Bestrahlung (rechts) nach 30 min Bestrahlung

Bestrahlung im UVA-Bereich bewirkte einen langsameren Abbau der fünf Fluorchinolone als UVC-Bestrahlung. Bei UVC-Bestrahlung können zusätzlich OH-Radikale entstehen, siehe Gleichung 2.1, die den Abbau beschleunigen. Unter den Fluorchinolonen konnte der schnellste Abbau bei Lomefloxacin beobachtet werden, gefolgt von Enoxacin. Am langsamsten wurde Levofloxacin abgebaut.

Der Betrachtung der Quanteneffizienz für die Degradationsexperimente soll nun ein detailliertes Bild liefern. Hierzu wurden die Quanteneffizienzen für die Wellenlängen 254, 313 und 365 nm bestimmt, siehe Tab. 4.5.

**Tab. 4.5**      **Ermittelte Quanteneffizienz, Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeit der Fluorchinolone unter UVA- und UVC-Bestrahlung**

Fluorchinolon	Bestrahlungs- quelle	$c_0$ /mg/L	$k_1$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$\Phi_{254nm}$	$\Phi_{313nm}$	$\Phi_{365nm}$
<b>Ciprofloxacin</b>	UVA	9.9	0.19	3.65	-	1.50E-01	6.50E-02
	UVC	10.2	0.57	1.22	1.50E-02	1.31E-01	3.86E-01
<b>Enoxacin</b>	UVA	10.5	0.55	1.26	-	7.94E-01	5.08E-01
	UVC	10.4	0.72	0.96	1.54E-02	3.02E-01	1.32E+00
<b>Levofloxacin</b>	UVA	12.0	0.05	13.86	-	4.21E-02	1.79E-02
	UVC	12.0	0.38	1.82	8.83E-03	9.29E-02	2.70E-01
<b>Lomefloxacin</b>	UVA	19.9	0.82	0.85	-	5.15E-01	3.18E-01
	UVC	20.0	0.80	0.87	2.23E-02	1.46E-01	6.15E-01
<b>Norfloxacin</b>	UVA	10.4	0.16	4.33	-	1.69E-01	1.21E-01
	UVC	10.4	0.69	1.00	2.63E-02	2.12E-01	1.03E+00

Dadurch, dass die UVA-Lampe keine Strahlung bei 254 nm emittierte, konnte für diese Wellenlänge keine Quanteneffizienz ermittelt werden. Die Quanteneffizienzen bei UVC-Bestrahlung zeigen, dass diese bei Levofloxacin geringer waren als bei den anderen Fluorchinolonen. Bei Lome- und Norfloxacin lag die Quanteneffizienz am höchsten. Bei der Wellenlänge 313 nm konnten Unterschiede zwischen UVA- und UVC-Bestrahlung beobachtet werden. Aus den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten lässt sich schließen, dass der Abbau mit UVC-Bestrahlung schneller verlief als der Abbau unter UVA-Bestrahlung. Betrachtet man jedoch die Quanteneffizienzen bei 313 nm, so lässt sich erkennen, dass diese bei UVA-Bestrahlung bei den meisten Fluorchinolone höher waren. Daraus lässt sich schließen, dass der Abbau mit der UVA-Bestrahlung bei 313 nm effektiver ist als bei UVC-Bestrahlung. Bei 365 nm wurde das Gegenteil beobachtet. Hier konnten auch Werte bei UVC-Bestrahlung über 1 ermittelt werden. Dies könnte auf einen zusätzlichen Abbaumechanismus hinweisen. Allgemein lässt sich sagen, dass UVC-Bestrahlung zu einem schnelleren Abbau führt. UVA-Bestrahlung zeigt eine besserer Quanteneffizienz, das heißt die eingestrahlte Energie wird bei UVA-Bestrahlung besser genutzt.

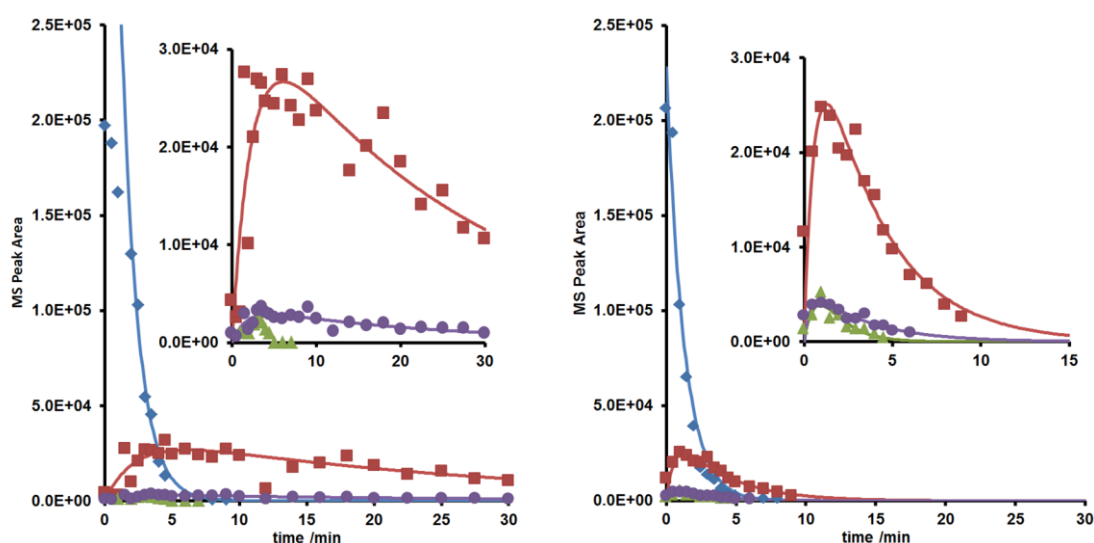
Bei den Abbauversuchen konnten Photodegradationsprodukte identifiziert werden. Sie sind in der Tabelle 4.6 dargestellt sind.

**Tab. 4.6** Mittels MS<sup>n</sup> identifizierte Wirkstoffe und deren Photodegradanten, die durch UVA- bzw. UVC-Bestrahlung bei pH 6-7 entstanden sind. Die Analysen erfolgten mittels HPLC-ESI-IT-MS.

Bestrahlungs- quelle	Ausgangssubstanz	MS	Photodegradant	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>
		[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>
UVA	Ciprofloxacin	332		288	268; 245
	Enoxacin	321		303	283; 232
			323	305	287; 305
	Levofloxacin	362		318	261
	Lomefloxacin	352		308	265; 288
			308	-	-
			332	288	268; 245
			350	-	-
	Norfloxacin	320		276	256; 233
			318	-	-
UVC	Ciprofloxacin	332		288	268; 245
			330	-	-
	Enoxacin	321		303	283; 232
			319	-	-
			323	305	287; 305
	Levofloxacin	362		318	261
	Lomefloxacin	352		308	265; 288
			308	-	-
			332	288	268; 245
			350	-	-
	Norfloxacin	320		276	256; 233
			318	-	-

Bei Levofloxacin konnten keine Produkte identifiziert werden. Für die Fluorchinolone Enoxacin, Lomefloxacin und Norfloxacin wurden Produkte bei UVA- und UVC-Bestrahlung beobachtet, für Ciprofloxacin dagegen nur bei UVC-Bestrahlung. Die Strukturen sind im Anhang A dargestellt. Die Konzentrations-Zeit Kurven zu den gefundenen Photodegradanten wurden nach den Modellen der Folge-Reaktion, Gleichung 2.22 gefittet. Dies ist am Beispiel von Lomefloxacin in Abb. 4.9 dargestellt.





**Abb. 4.9** Konzentrations-Zeit Kurven von Lomefloxacin (blau) und dessen Photodegradanten mit  $m/z = 308$  (grün),  $332$  (rot) und  $350$  (lila) erhalten durch UVA-Bestrahlung (links) und UVC-Bestrahlung (rechts) bei pH 6-7. Dargestellt ist außerdem jeweils eine Vergrößerung im Diagramm integriert.

Auffällig bei den Kurvenverläufen der Photodegradanten ist, dass durch UVC-Bestrahlung die Produkte nach 15 min vollständig eliminiert wurden, bei UVA-Bestrahlung konnte nur das Degradationsprodukt 308 innerhalb dieser Zeit eliminiert werden, wobei die anderen beiden Photodegradanten selbst nach 30 min Bestrahlung nicht aus dem Wasser entfernt werden konnten. Diese Tatsache wird auch durch die Geschwindigkeitskonstanten widerspiegelt, siehe Tab. 4.7. Einige Produkte konnten aufgrund schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses bei der Detektion nicht kinetisch analysiert werden. Sie wurden in dieser Tabelle nicht mit aufgeführt.

**Tab. 4.7** Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Photodegradanten

Bestrahlungsquelle	Produkt	$k_1 / \text{min}^{-1}$	$t_{1/2} \text{ min}$	$k_2 / \text{min}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{min}$
UVA	Lom332	0.04	17.88	0.44	1.58
	Lom350	0.04	15.76	0.62	1.12
UVC	Eno319	0.74	0.93	1.60	0.43
	Lom308	0.84	0.82	1.44	0.48
	Lom332	0.27	2.51	1.74	0.40
	Lom350	0.30	2.30	2.92	0.24
	Nor318	0.77	0.90	1.01	0.69

Als Folge von UVA-Bestrahlung wurde ein langsamer Aufbau der Photodegradanten bzw. eine niedrigere Geschwindigkeitskonstante bestimmt. Auch der Abbau der Zwischenprodukte erfolgt bei UVA-Bestrahlung langsamer als unter UVC-Bestrahlung. Die Geschwindigkeit der Photodegradation insgesamt vervierfachte sich durch die Anwendung einer UVC-Lampe.

Interessant ist nun, ob die entstandenen Produkte höhere Wirksamkeit besitzen und daher gegebenenfalls eine höhere Ökotoxizität aufweisen. Dies wurde anhand der MHK-Werte verschiedener Proben, die nach einer bestimmten Bestrahlungsdauer untersucht wurden, ermittelt, siehe Tab. 4.8.

**Tab. 4.8**      **Ermittelte MHK-Werte von Ciprofloxacin, Enoxacin, Levofloxacin, Lomefloxacin und Norfloxacin gegen *Ps. fluorescens* und *B. subtilis* in Abhängigkeit von der UVA- und UVC-Bestrahlungszeit**

Substanz	Bestrahlungszeit /min	<i>Ps. fluorescens</i> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>B. subtilis</i> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>Ps. fluorescens</i> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>B. subtilis</i> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
		UVA-Bestrahlung		UVC-Bestrahlung	
Ciprofloxacin	0	0.15	0.08	0.16	0.08
	1	0.15	0.08	0.16	0.16
	2.5	0.15	0.15	0.64	0.64
	3.5	0.31	0.15	0.64	0.64
	5	0.31	0.31	>0.64	>0.64
	7	0.62	0.31	>0.64	>0.64
	30	>0.62	>0.62	>0.64	>0.64
Enoxacin	0	0.64	0.64	0.64	0.32
	1	0.64	0.64	1.27	1.27
	2.5	1.29	1.29	2.55	2.55
	3.5	2.57	2.57	5.10	2.55
	5	2.57	2.57	5.10	>2.55
	7	5.15	>2.57	>5.10	>2.55
	30	>5.15	>2.57	>5.10	>2.55
Levofloxacin	0	0.37	<0.05	0.37	<0.05
	1	0.37	<0.05	0.37	0.09
	2.5	0.37	0.09	0.74	0.09
	3.5	0.37	0.09	0.74	0.09
	5	0.37	0.09	>0.74	0.37
	7	0.37	0.09	>0.74	0.74
	30	0.74	0.18	>0.74	>0.74

---

Lomefloxacin	0	<0.55	0.28	<0.55	0.28
	1	<0.55	0.28	1.11	0.55
	2.5	1.10	0.55	4.44	2.22
	3.5	2.21	1.10	8.88	>2.22
	5	4.42	2.21	>8.88	>2.22
	7	8.83	>2.21	>8.88	>2.22
	30	>8.83	>2.21	>8.88	>2.22
Norfloxacin	0	0.65	0.65	0.65	0.65
	1	0.65	0.65	1.30	0.65
	2.5	0.65	0.65	2.60	2.60
	3.5	0.65	0.65	5.20	5.20
	5	1.30	1.30	>5.20	>5.20
	7	1.30	1.30	>5.20	>5.20
	30	>5.20	>5.20	>5.20	>5.20

---

Bei allen durchgeführten Versuchen stieg der MHK-Wert, je länger die Lösung des Fluorchinolons bestrahlt wurde. Das bedeutet, je länger die Bestrahlung, desto geringer die Wirksamkeit gegen die beiden Mikroorganismenstämme. Die entstandenen Photodegradanten, die sich ebenfalls in der Lösung bildeten, hatten auf den MHK-Wert keinen erkennbaren Einfluss. Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine oder eine gegenüber dem Ausgangswirkstoff geringere Wirksamkeit der Produkte bestand.

Interessant ist der Aktivitätsunterschied bei Verwendung verschiedener Strahlungsbereiche. Durch die UVC-Bestrahlung konnte ein schnellerer Anstieg beobachtet werden als bei UVA-Bestrahlung. Diese Tatsache spiegelt die vorherige Analyse wieder. Dort verlief der Abbau der Substanz ebenfalls bei UVC-Bestrahlung schneller. Somit wurde die Wirksamkeit, die von der Ausgangssubstanz ausging, gegenüber den beiden Mikroorganismen schneller erniedrigt.

Fluorchinolone sind gegen gram-positive und gram-negative Organismen wirksam. Dies lässt sich ebenfalls aus dieser Versuchsreihe wiedererkennen.

### **4.3.2 Visualisierung der Einflussfaktoren auf die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten**

In diesem Kapitel wird die Möglichkeit zur Anwendung eines multivariaten Verfahrens, der Hauptkomponentenanalyse (PCA), zur Visualisierung der Einflussfaktoren auf die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten demonstriert. Die fünf Fluorchinolone dieser Arbeit wurden bei pH 3-4, pH 6-7 und pH 8-9 für 10 min mit UV-Licht bestrahlt. Der Einfluss von TiO<sub>2</sub>-Zugabe und UVA-Bestrahlung wurde beobachtet. Dazu wurde die photoaktivierte Modifikation von TiO<sub>2</sub> P25 eingesetzt. Die eingesetzten TiO<sub>2</sub>-Konzentrationen betrugen 50 mg/L und 100 mg/L mit einem Kontrollversuch in Abwesenheit von TiO<sub>2</sub>. Pro Wirkstoff wurden daher 9 Geschwindigkeitskonstanten erhalten. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind in Tab. 4.9 aufgelistet.

**Tab. 4.9** Geschwindigkeitskonstanten mit den daraus resultierenden Halbwertszeiten von Fluorchinolonen bei UVA-Bestrahlung und TiO<sub>2</sub>-Zugabe

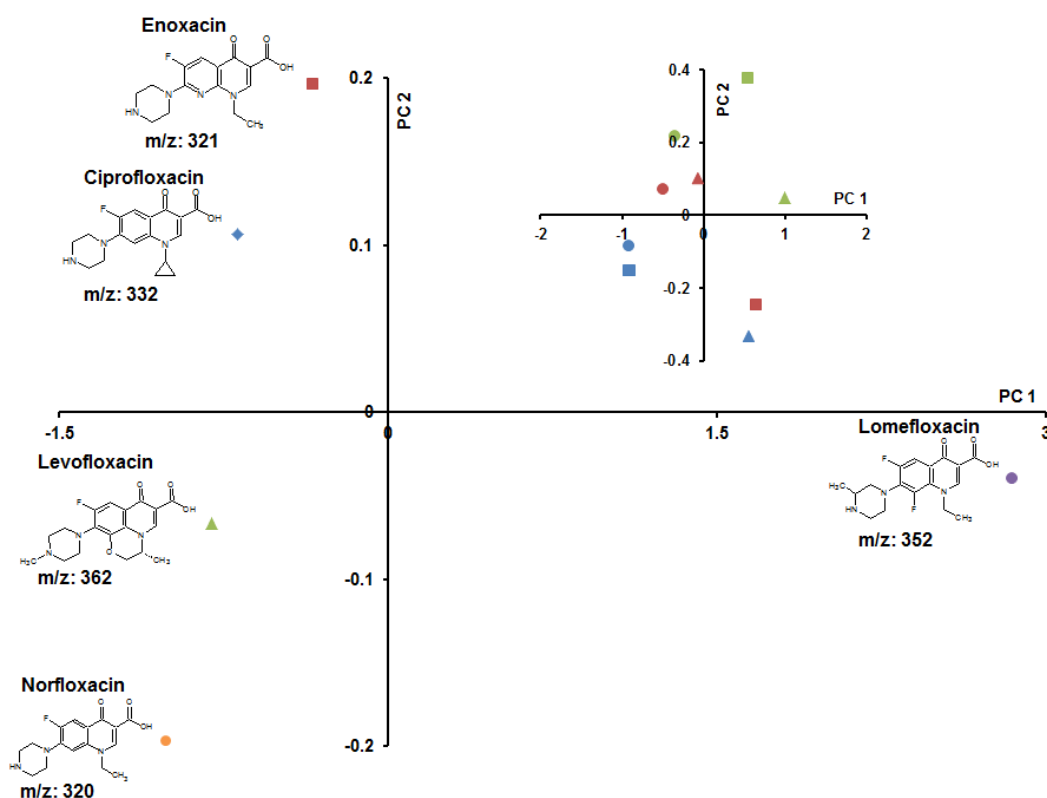
pH	TiO <sub>2</sub>	Ciprofloxacin		Enoxacin		Levofloxacin		Lomefloxacin		Norfloxacin	
	P25	<i>k</i>	<i>t</i> <sub>1/2</sub>	<i>k</i>	<i>t</i> <sub>1/2</sub>	<i>k</i>	<i>t</i> <sub>1/2</sub>	<i>k</i>	<i>t</i> <sub>1/2</sub>	<i>k</i>	<i>t</i> <sub>1/2</sub>
		/min <sup>-1</sup>	/min	/min <sup>-1</sup>	/min	/min <sup>-1</sup>	/min	/min <sup>-1</sup>	/min	/min <sup>-1</sup>	/min
3-4	-	0.05	12.9	0.04	18.31	0.01	92.17	0.70	0.99	0.03	25.05
	50	0.13	5.41	0.17	3.98	0.07	10.47	1.71	0.41	0.08	8.20
	100	0.15	4.76	0.18	3.82	0.14	4.98	0.79	0.88	0.12	5.79
6-7	-	0.21	3.32	0.65	1.06	0.06	10.86	2.16	0.32	0.13	5.40
	50	0.21	3.28	0.45	1.53	0.16	4.29	1.07	0.65	0.20	3.52
	100	0.39	1.78	0.46	1.51	0.20	3.54	1.42	0.49	0.38	1.81
8-9	-	0.23	3.05	1.14	0.61	0.06	10.72	3.03	0.23	0.13	5.27
	50	0.27	2.57	0.32	2.15	0.32	2.19	0.80	0.87	0.17	4.03
	100	0.33	2.09	0.42	1.65	0.23	2.99	1.05	0.66	0.28	2.47

Da sich Hydroxylradikale aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nur durch UVC-Strahlung bilden, wurde zur Untersuchung des Einflusses von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe die UVC-Lampe verwendet. Dazu wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration bei den drei pH-Werten variiert; einmal ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe, dann mit 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und mit 30 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die aus den Degradationsversuchen erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten und die damit verbundenen Halbwertszeiten sind in Tab. 4.10 dargestellt.

**Tab. 4.10** Geschwindigkeitskonstanten von Fluorchinolonen und die damit verbundenen Halbwertszeiten; UVC-Bestrahlung und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe bei drei verschiedenen pH-Werten

pH	$\text{H}_2\text{O}_2$ /mg·L <sup>-1</sup>	Ciprofloxacin		Enoxacin		Levofloxacin		Lomefloxacin		Norfloxacin	
		$k$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min
3-4	-	0.14	4.89	0.20	3.53	0.29	2.41	0.57	1.21	0.25	2.81
	10	0.35	1.99	0.31	2.23	0.44	1.58	0.93	0.75	0.33	2.13
	30	0.44	1.58	0.43	1.60	0.43	1.61	1.03	0.68	0.48	1.45
6-7	-	0.23	3.03	0.23	3.01	0.18	3.82	2.83	0.24	0.13	5.36
	10	0.51	1.36	0.44	1.58	0.30	2.35	2.10	0.33	0.17	4.06
	30	0.51	1.37	0.80	0.86	0.61	1.14	1.84	0.38	0.56	1.24
8-9	-	0.22	3.16	0.42	1.65	0.21	3.26	2.25	0.28	0.26	2.65
	10	0.34	2.03	0.67	1.04	0.35	2.01	1.30	0.53	0.28	2.51
	30	0.61	1.14	0.79	0.88	0.47	1.46	2.34	0.30	0.24	2.83

Auch hier wurden 9 Geschwindigkeitskonstanten pro Fluorchinolon erhalten. Um Trends und systematisches Verhalten leichter zu erkennen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Das Ergebnis der PCA-Untersuchungen auf Basis der Datenmatrices mit den in Tab. 4.10 aufgeführten Geschwindigkeitskonstanten der fünf Fluorchinolone bei der Photodegradation, ist in Abb. 4.10 dargestellt.

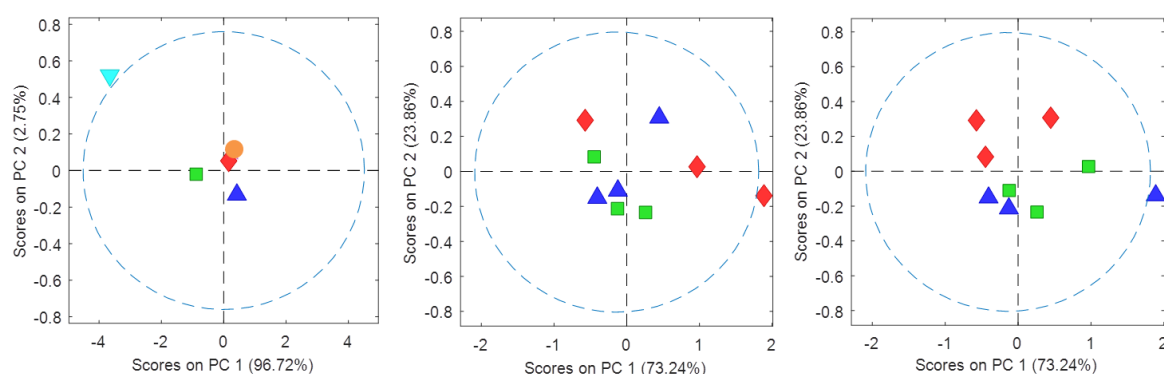


**Abb. 4.10** Klassifizierung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der fünf Fluorchinolone mittels PCA. Der Einfluss der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ist im Einschub oben rechts dargestellt. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen betragen 0 mg/L (blau), 10 mg/L (rot) und 30 mg/L (grün); bei pH 3-4 (Punkte), pH 6-7 (Quadrate) und pH 8-9 (Dreiecke). Analyse erfolgte mit MatLab 2015b.

Die erste Hauptkomponente (PC1) in Abb. 4.10 repräsentiert hauptsächlich die Abbaugeschwindigkeit. Auffällig bei der PCA ist, dass vier Fluorchinolone im negativen Bereich von PC1 liegen und Lomefloxacin im positiven liegt. Bei Lomefloxacin wurde allgemein eine höhere Abbaugeschwindigkeit vorgefunden. Es ist bekannt, dass OH-Radikale, die beim Photoabbau von Wasser oder durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  entstehen, bevorzugt das Fluoratom substituieren<sup>65,189</sup>. Lomefloxacin besitzt im Vergleich zu den anderen vier Fluorchinolonen zwei Fluoratome, so dass die Wahrscheinlichkeit des Abbaus im Vergleich der anderen Fluorchinolonen. Im positiven Bereich der PC2 befinden sich Ciprofloxacin und Enoxacin, im negativen Bereich Norfloxacin und Levofloxacin. Aufgrund der Ähnlichkeit der Strukturen von Ciprofloxacin und Enoxacin könnte ein ähnliches Verhalten bzgl. der Abbaugeschwindigkeiten vorliegen. Daher wurden sie zusammen geclustert. PC2 trennt die Geschwindigkeiten des photoinduzierten

Abbaus anhand der Strukturmerkmale. Da die Werte von 4 der Fluorchinolone ähnlich sind, wurde die zweite Datenmatrix, in dem der Einfluss der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe und pH-Werte, ebenfalls mittels PCA analysiert, siehe Abb. 4.9 oben rechts. Entlang der zweiten Hauptkomponente ist die Trennung nach der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in der Lösung zu erkennen. Die höheren  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen befinden sich im oberen Teil, die niedrigeren Konzentrationen im unteren Teil. Entlang der ersten Hauptkomponenten lässt sich keinen Trend erkennen. Der pH-Wert hat auch keinen Einfluss auf die photoinduzierte Degradation. Da hier lediglich die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Abbauprobe bei verschiedenen Bedingungen einen Einfluss auf die PCA haben, wurden demnach die höchsten Geschwindigkeiten bei höherer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration beobachtet. Wie in diesem Beispiel gezeigt, kann mit Hilfe der PCA die Analyse der Geschwindigkeitskonstanten visuell dargestellt werden. Die Matrixreduzierung ermöglicht einfache Zusammenhänge besser darzustellen. Gerade für noch komplexere Datenmatrices ermöglicht die PCA einfache Darstellungswege.

Ähnlich wurde auch bei der PCA mit Geschwindigkeitskonstanten, die aus den UVA-Bestrahlungsversuchen und Zugabe von  $\text{TiO}_2$  bestimmt wurden, vorgegangen. Die resultierenden Ergebnisse sind in Abb. 4.11 dargestellt.



**Abb. 4.11** PCA mit den Geschwindigkeitskonstanten der Fluorchinolone aus den Abbauprobe unter UVA-Bestrahlung mit  $\text{TiO}_2$ -Zugabe (links) Ciprofloxacin (rot), Enoxacin (grün), Levofloxacin (blau), Lomefloxacin (hellblau) und Norfloxacin (orange), farbig codiert nach der  $\text{TiO}_2$ -Zugabe (mitte) von 0 mg/L (rot), 50 mg/L (blau) und 100 mg/L (grün) bzw. (rechts) farbig codiert nach pH-Wert 3-4 (rot), 6-7 (grün) und 8-9 (blau). Berechnet mit Hilfe der Eigenvector Toolbox



Bei der PCA-Analyse der Versuche mit UVA-Bestrahlung und  $\text{TiO}_2$  wurden bis auf Lomefloxacin erneut alle Fluorchinolone zusammen geclustert. In Anwesenheit von  $\text{TiO}_2$  werden Radikale gebildet, die auch hier wieder die Fluoratome substituieren können, was zu einer Beschleunigung des Abbaus führt. Die anderen Fluorchinolone zeigen ähnliches Abbauverhalten und liegen daher auf beiden Hauptachsen eng zusammen. Um nun den Einfluss von  $\text{TiO}_2$  zu beurteilen, wurde die Geschwindigkeitskonstantenmatrix invertiert und hieraus auch mittels PCA durchgeführt, siehe Abb. 4.11 mitte. Hierbei zeigten sich keine Auffälligkeiten und ein Trend war nicht ersichtlich. Klassifiziert man diese Datenmatrix nicht nach der Konzentration von  $\text{TiO}_2$  sondern nach pH-Werten, so lässt sich doch ein Trend erkennen, siehe Abb. 4.11 rechts. Die zweite Hauptkomponente (PC2) repräsentiert die Geschwindigkeit der Degradation. Von oben nach unten nimmt die Geschwindigkeit zu. Bei pH 8-9 erfolgt demnach der schnellste Abbau durch UVA-Bestrahlung und  $\text{TiO}_2$ -Zugabe. Dies könnte daran liegen, dass die im Basischen vorliegende Struktur der Fluorchinolone den Abbau im Sinne einer Beschleunigung begünstigt.

Auch bei dieser PCA zeigte sich, dass sich mittels multivariater Verfahren Zusammenhänge besser darstellen und erklären lassen. Für größere Datenmatrizes bieten sich für eine Vereinfachung der Auswertung multivariate Verfahren an.

### **4.3.3 Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten bei UVA- und UVC-Bestrahlung**

Detaillierte Beobachtungen der Abbaugeschwindigkeiten wurden bei Enoxacin, Levofloxacin und Lomefloxacin durchgeführt. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten, Halbwertszeiten und Quanteneffizienzen bei drei verschiedenen Wellenlängen, sind in Tab. 4.11 dargestellt.

**Tab. 4.11** Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten, deren Halbwertszeiten und Quanteneffizienten bei den Wellenlängen 254 nm, 313 nm und 365 nm

Bestrahlungsquelle	Substanz	pH	$k_1$ /min	$t_{1/2}$ /min <sup>-1</sup>	$\Phi_{254\text{ nm}}$	$\Phi_{313\text{ nm}}$	$\Phi_{365\text{ nm}}$
UVA	Enoxacin	3-4	0.01	69.31	-	1.9E-02	4.7E-03
		6-7	0.39	1.78	-	4.9E-01	3.1E-01
		8-9	0.70	0.99	-	9.2E-01	1.4E-01
	Levofloxaicin	3-4	0.01	89.38	-	4.5E-03	1.6E-03
		6-7	0.06	10.86	-	4.7E-02	2.0E-02
		8-9	0.06	10.72	-	4.8E-02	1.9E-02
	Lomefloxacin	3-4	0.96	0.72	-	6.3E-01	2.9E-01
		6-7	1.22	0.57	-	7.3E-01	4.5E-01
		8-9	1.99	0.35	-	1.3E+00	7.9E-01
UVC	Enoxacin	3-4	0.20	3.53	6.0E-03	1.3E-01	2.2E-01
		6-7	0.23	3.01	4.9E-03	9.6E-02	4.2E-01
		8-9	0.42	1.65	9.6E-03	1.8E-01	2.0E-01
	Levofloxaicin	3-4	0.29	2.41	6.8E-03	5.7E-02	1.4E-01
		6-7	0.18	3.82	4.2E-03	4.4E-02	1.3E-01
		8-9	0.21	3.26	4.1E-03	5.2E-02	1.4E-01
	Lomefloxacin	3-4	0.57	1.21	1.5E-02	1.3E-01	3.9E-01
		6-7	2.83	0.24	8.7E-02	5.7E-01	2.4E+00
		8-9	2.04	0.34	5.5E-02	4.5E-01	1.9E+00

Bis auf die berechneten Quanteneffizienten von Lomefloxacin sind die Werte unter 1 und vergleichbar mit den Quanteneffizienten in Tab. 4.5. Die photoinduzierte Degradation von Lomefloxacin wird wegen der beiden Fluoratome durch den OH-Radikal induzierten Abbau im Vergleich zu den anderen vier Fluorchinolonen bevorzugt, die jeweils nur ein Fluoratom besitzen. Erkenntlich ist dies auch an der Quanteneffizienz, die über 1 liegt.

Die Degradation von Enoxacin und Levofloxacin verläuft unter UVA-Bestrahlung im Vergleich zu UVC-Bestrahlung viel seltener oder langsamer, unabhängig vom pH-Wert. Bei pH 3-4 unter UVA-Bestrahlung wurde der langsamste Abbau beobachtet. Eine Erhöhung des pH-Wertes weist einen positiven Effekt bzgl. der Abbaugeschwindigkeit auf. Dies gilt besonders bei UVA-Bestrahlung, wie schon bereits im vorhergegangenen Kapitel 4.3.2 erwähnt und mittels PCA dargestellt wurde. So kann davon ausgegangen werden, dass die Strukturen der Fluorchinolone, die sich bei unterschiedlichen pH-Werten in Hinblick auf ihre Ladungslokalisierung unterscheiden, Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit hat. Bei pH 8-9 kann das Molekül als Zwitterion vorliegen oder

auch positiv geladen sein. Dies hängt im Wesentlichen von der Basizität der in den Substituenten befindlichen Stickstoffatome ab. Die Ladungsverteilung hat offensichtlich einen positiven Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit.

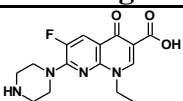
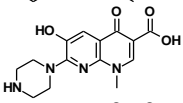
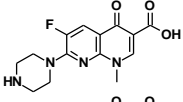
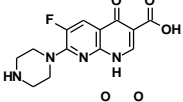
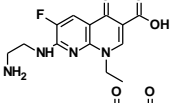
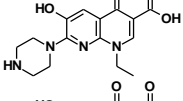
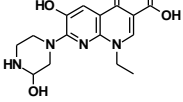
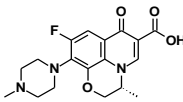
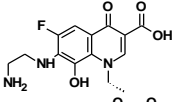
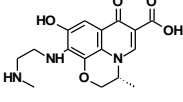
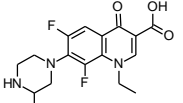
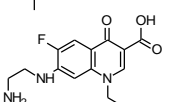
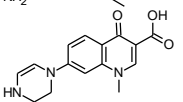
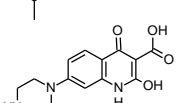
Aus der Bestimmung der Quanteneffizienzen der Fluorchinolone lässt sich gut erkennen, welche Wellenlänge und Intensität ausgehend von beiden UV-Lampen den größten Einfluss auf den Mechanismus hat. Bei der Wellenlänge 365 nm übt die UVA-Lampe einen größeren Einfluss auf den Abbau aus als die UVC-Lampe. Hier variieren die Werte zwischen  $7.9\text{E-}01$  bis  $1.6\text{E-}03$  unter UVA-Bestrahlung und unter UVC-Bestrahlung zwischen  $2.4$  bis  $1.3\text{E-}01$ . Somit kann aus der Bestimmung der Quanteneffizienzen der einzelnen Wellenlängen, die von der Einstrahlungsleistung der jeweiligen Lampe abhängt, die effizientere Bestrahlungsmethode ermittelt werden.

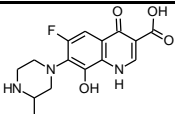
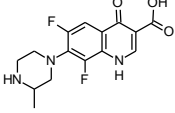
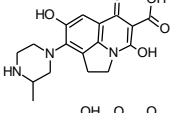
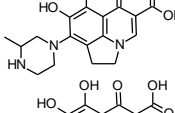
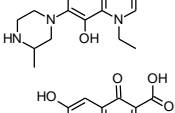
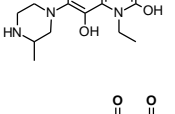
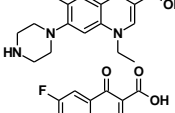
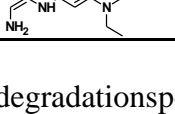
#### **4.3.4 Identifizierung neuer Photodegradanten**

Es konnten eine Vielzahl durch UV-Bestrahlung entstandene Produkte bei den Abbauxperimenten gefunden werden, siehe Anhang A. Auch konnten bisher nicht beschriebene Produkte gefunden und identifiziert werden. Diese sind mit Angabe ihrer Struktur und höherer MS-Fragmente in Tab. 4.12 dargestellt.

Die Strukturvorschläge wurden aus der Masse des Quasimoleküls abgeleitet und mittels  $\text{MS}^2$  und  $\text{MS}^3$  abgesichert.

**Tab. 4.12** Neu-identifizierte neue Photodegradationsprodukte der 5 untersuchten Fluorchinolone mit Retentionszeit  $R_t$ , m/z-Verhältnis von Quasimolekülen und höheren MS-Fragmenten

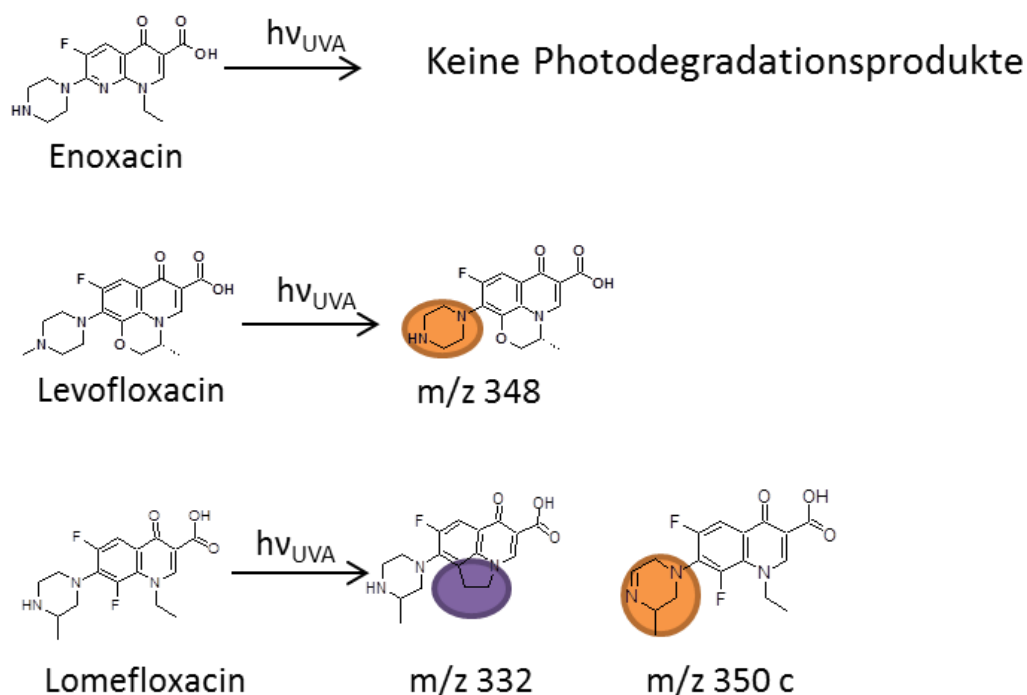
Fluorchinolon	$R_t$ [min]	$[M+H]^+$	$MS^2$	$MS^3$	Struktur- vorschlag
<b>Enoxacin</b>	6.5	321	303		
	1.5	305	287		
	1.8	307	289		
	5.2	293	273		
	5.4	295	277		
	5.8	319	301		
	8.1	335	317		
<b>Levofloxacin</b>	6.2	362	318	261	
	5.3	310			
	1.8	334	277	235	
<b>Lomefloxacin</b>	10.0	352	308	265	
	5.8	294	276		
	1.6	300			
	1.8	304			

	2.7	322			
	3.2	324	281	253	
	2.1	346			
	5.0				
	4.3	364	346	195	
	7.0				
<b>Norfloxacin</b>	9.0	320	276	256	
	1.9	292	272	226	

In dieser Arbeit konnten für Ciprofloxacin keine neuen Photodegradationsprodukte identifiziert werden. Für Norfloxacin konnte ein unbekanntes Photodegradationsprodukt gefunden und ein Strukturvorschlag erarbeitet werden. Bei Enoxacin, Levofloxacin und Norfloxacin konnten mehrere neue Photoprodukte identifiziert werden. Deshalb werden die letztgenannten drei Fluorchinolone in Kap. 4.3.5 detaillierter betrachtet.

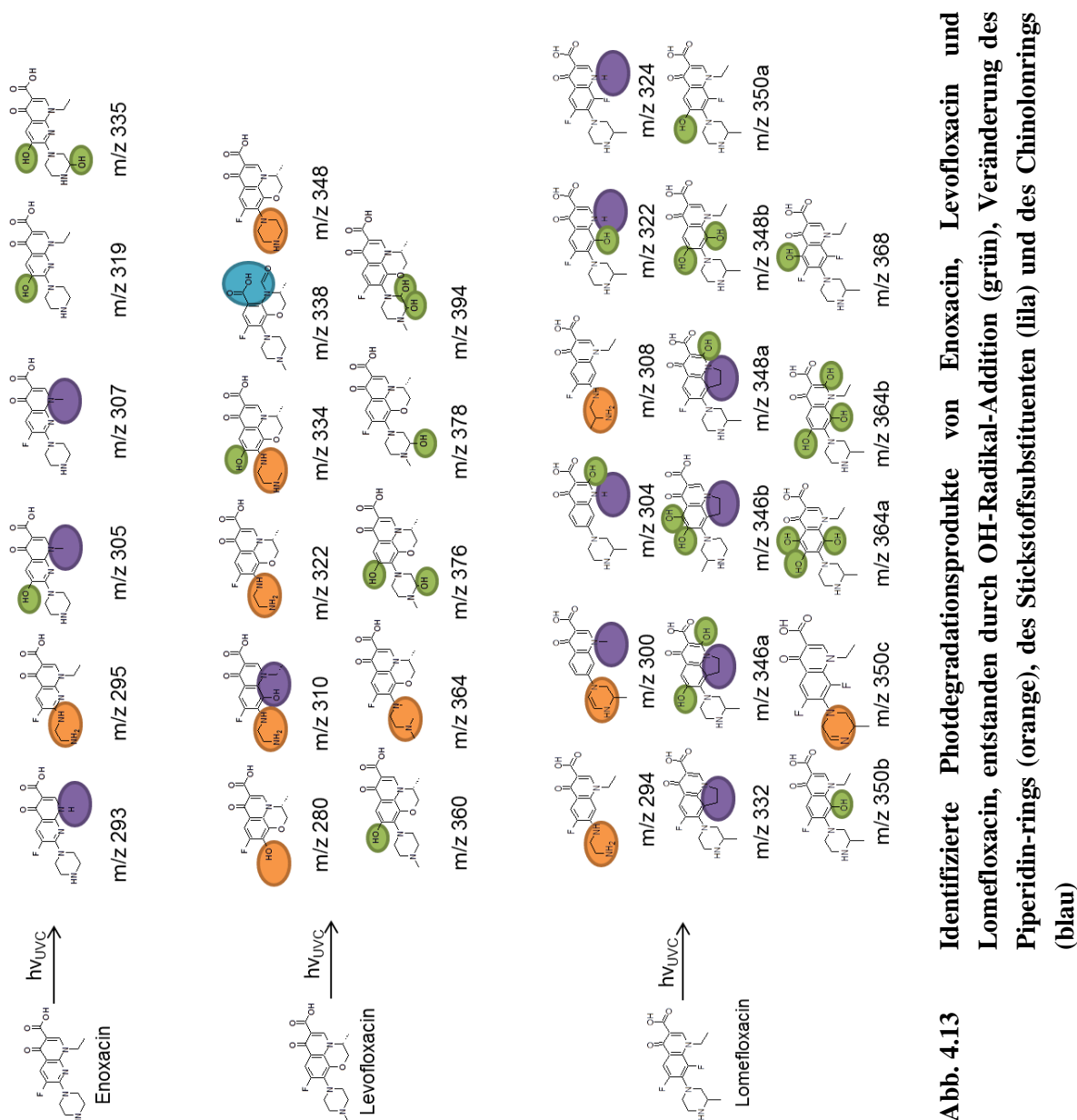
#### 4.3.5 Photodegradanten von Enoxacin, Levofloxacin und Lomefloxacin während UVA- und UVC-Bestrahlung

Es konnten eine Reihe von Degradationsprodukten während des photoinduzierten Abbaus durch UVA- und UVC-Bestrahlung von Enoxacin, Levofloxacin und Lomefloxacin identifiziert werden. In Abb. 4.12 sind die Photodegradationsprodukte, die durch UVA-Bestrahlung entstanden sind, in Abb. 4.13 die durch UVC-Bestrahlung entstanden, dargestellt.



**Abb. 4.12** Identifizierte Photdegradationsprodukte von Enoxacin, Levofloxacin und Lomefloxacin, entstanden durch Veränderung des Piperidin-Rings (orange) und Veränderung des Stickstoffsubstituenten (lila)

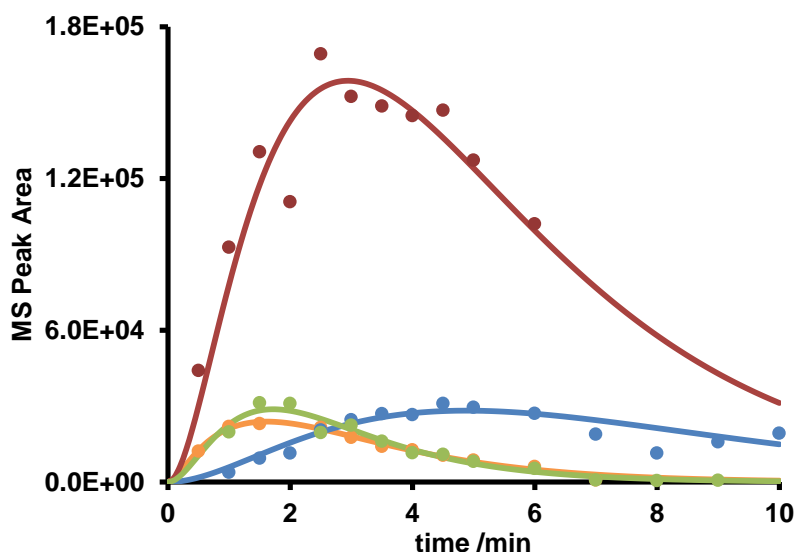
Bei UVA-Bestrahlung wurden bei Enoxacin keine Photodegradationsprodukte gefunden. Bei Levofloxacin und Lomefloxacin fällt auf, dass die drei beobachteten Produkte ausschließlich Veränderung an dem Piperidin-Ring und am Stickstoffsubstituenten aufweisen. Die Entstehung der Produkte setzte erst nach 5 min Bestrahlung ein und verlief relativ langsam, so dass eine Beschreibung der Konzentration-Zeit Kurven mit den aufgestellten Modellen keine sinnvollen Parameter lieferte.



Aus dem Vergleich von Abb. 4.12 und 4.13 ist direkt ersichtlich, dass UVC-Bestrahlung zu einer deutlich höheren Anzahl an Photodegradanten führt. Auffällig ist, dass bei UVC-Bestrahlung eine Reihe von OH-Radikal-Additionen bzw. Substitutionsprodukten auftraten. Daraus lässt sich schließen, dass der Abbau wesentlich durch die aus Wasser entstandenen OH-Radikale erfolgte und dieser Mechanismus den Abbau dominieren dürfte. Bei Lomefloxacin wurden im Vergleich zu den anderen Fluorchinolonen deutlich mehr Produkte gefunden und identifiziert. Die Strukturen der Produkte deuten auf verschiedene Mechanismen hin, über die der Abbau verlaufen könnte. Aber auch die

beiden Fluoratome von dem Lomefloxacin führten aufgrund ihrer hohen Substitutionstendenz zu mehr Produkten.

Die aufgenommenen Konzentrations-Zeit Daten konnten als Folge- bzw. Folge-Folge-Reaktion nach Gleichung 2.22 und Gleichung 2.24 modelliert werden. Die Resultate sind beispielhaft für Lomefloxacin in Abb. 4.14 dargestellt.



**Abb. 4.14** Modellierte Konzentrations-Zeit Kurven von den Photodegradanten von Lomefloxacin mit  $m/z = 308$  (gelb),  $m/z = 332$  (rot),  $m/z = 348$  (blau) und  $m/z = 368$  (grün) bei pH 3-4

Die Intensität des Degradanten mit  $m/z = 332$  war hierbei am größten. Die anderen Substanzen entstanden im Vergleich dazu in deutlich geringerer Häufigkeit. Hierbei muss aber noch zusätzlich berücksichtigt werden, dass evtl. die Ionisierbarkeit und Ionisierungseffizienz der einzelnen Produkte im Massenspektrometer verschieden sind. Dies hat keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit und deren Ermittlung, da die Ionisierung einer Substanz unter gleichen HPLC-Bedingungen immer gleich ist. Um die Geschwindigkeiten der einzelnen Zwischenprodukte zu vergleichen, wurden die Geschwindigkeitskonstanten bestimmt. Beispielhaft sind alle erfolgreich bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Photodegradanten von Lomefloxacin und deren Halbwertszeiten in Tab. 4.13 wiedergegeben.



Für die anderen Fluorchinolone und ihre Degradanten wurden ebenfalls die Geschwindigkeitskonstanten bestimmt. Sie sind in Anhang A aufgeführt.

**Tab. 4.13** Geschwindigkeitskonstanten und zugehörige Halbwertszeiten für die Photodegradanten von Lomefloxacin in wässriger Lösung bei pH 3-4

Zwischenprodukt	$k_1$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k_2$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k_3$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min
308 $R_t$ 7.3 min	0.59	1.17	0.78	0.89	7.65	0.09
332 $R_t$ 5.7 min	0.43	1.63	0.43	1.61	1.99	0.35
348 $R_t$ 3.0 min	0.30	2.31	0.48	1.45	0.48	1.45
368 $R_t$ 2.9 min	0.60	1.16	1.58	0.44	1.57	0.44

Die Abbaugeschwindigkeit von Lomefloxacin bei pH 3-4 betrug 0.57 min<sup>-1</sup>. Die Resultate in Tabelle 4.13 zeigen, dass die Werte für  $k_1$  bei den Zwischenprodukten 308 und 368 etwas höher sind als die beim Lomefloxacinabbaus. Dies ist auf Unsicherheit der Kalkulation, d. h. des Fittings zurückzuführen. In Abb. 4.13 ist deutlich erkennbar, dass die gefittete Kurve von  $m/z = 332$  nicht genau durch alle gemessenen Werte verläuft. Die Modellierung ist fehlerbehaftet.

Anhand von  $k_1$  ist ersichtlich, welche Zwischenprodukte zuerst bzw. am schnellsten entstehen. Im Fall von Lomefloxacin entstanden die Zwischenprodukte  $m/z=368$  und  $m/z=308$  am schnellsten, am langsamsten das Zwischenprodukt  $m/z=348$ . Die Anlagerung des OH-Radikals an das Fluorchinolon und die Aufbrechung des Piperidin-Rings erfolgte demnach am schnellsten, gefolgt von der Substitution des Fluoratoms durch ein OH-Radikal. Da aber die Prozesse parallel oder leicht verzögert beobachtet werden, ist eine detaillierte Aufklärung des genauen Abbaumechanismus nicht möglich.

Anhand der Modellierung lässt sich jetzt nicht nur bestimmen, wann die Hauptschubstanz aus dem Wasser eliminiert wurde, sondern auch wann und mit den Strukturvorschlägen wie die Zwischenprodukte entstanden und wieder abgebaut wurden. Haupt- und Zwischenprodukte müssen für die Abschätzung einer Gesamtbestrahlungsdauer, die zur vollständigen Eliminierung des Pharmazeutikums führen soll, berücksichtigt werden.

### 4.3.6 Vergleich der Photodegradationsversuche zwischen MilliQ-Wasser und Kläranlagenablauf

Für diese Versuchsreihe wurden Wasserproben aus dem Ablauf des Klärwerks Krefeld entnommen und jeweils mit 20 mg/L der drei Fluorchinolone versetzt. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 4.14 dargestellt.

**Tab. 4.14** Geschwindigkeitskonstanten und zugehörige Halbwertszeiten der Fluorchinolone und ihrer Degradanten in mit 20 mg/L des Antibiotikum versetzten Wasserproben aus dem Ablauf des Klärwerks Krefeld bei pH 8

Wirkstoff	Phototrans- formationsprodukt m/z	$k_1$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k_2$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min
<b>Enoxacin</b>		0.36	1.92		
	295	0.27	2.59	0.84	0.83
	319	0.32	2.17	0.32	2.17
<b>Levofloxacin</b>		0.12	5.93		
	348		nicht bestimmt		
	364		nicht bestimmt		
<b>Lomefloxacin</b>		1.47	0.47		
	294	1.00	0.70	0.65	1.07
	308	0.47	1.46	0.48	1.46
	332	0.12	5.64	0.46	1.49
	348		nicht bestimmt		
	350		nicht bestimmt		
	368	0.70	1.00	0.71	1.00

Im Vergleich zu den Versuchen in MilliQ-Wasser wurde ein langsamerer Abbau der Fluorchinolone beobachtet. Die Geschwindigkeitskonstante für Lomefloxacin bei pH 8-9 betrug in MilliQ-Wasser 2.25 min<sup>-1</sup> und im Effluent 1.47 min<sup>-1</sup>. Auch die Phototransformationsprodukte bildeten sich dementsprechend langsamer im Ablauf der Kläranlage. Ein Vergleich der Resultate der Degradationsprodukte von Enoxacin unterstützt diese Aussage. Das Produkt mit m/z = 295 wies Geschwindigkeitskonstanten von  $k = 0.27$  min<sup>-1</sup> im Effluent und  $k = 0.42$  min<sup>-1</sup> in MilliQ-Wasser auf. Dies ist auf Matrixeffekte im Kläranlagenwasser zurückzuführen, die den Abbau der Substanzen und Zwischenprodukte deutlich verlangsamten. Substanzen im Abwasser absorbieren und

streuen Licht und reduzieren damit die für den Abbau des Fluorchinolons zur Verfügung stehenden Lichtmenge, letztendlich sinkt die Quanteneffizienz.

#### 4.3.7 Beurteilung der möglichen photoinduzierten Ökotoxizität

Anhand Gleichung 2.31 wird die Zeit  $t_{akt}$  bestimmt, ab wann die Wirksamkeit der Mikroorganismen nachlässt. Die ermittelten Werte für die drei Fluorchinolone Enoxacin, Levofloxacin und Lomefloxacin in MilliQ-Wasser und Ablaufproben sind in Tab. 4.15 dargestellt.

**Tab. 4.15** Zeiten  $t_{akt}$ , nach denen die Wirksamkeit der Substanzen gegen *Ps. fluorescens* und *B. subtilis* nachlässt

Substanz	pH-Wert	Wasser	$t_{akt}$ ( <i>Ps. Fluorescens</i> ) /min	$t_{akt}$ ( <i>B. subtilis</i> ) /min
<b>Enoxacin</b>	3-4	MilliQ	18.06	22.55
	6-7	MilliQ	15.70	19.61
	8-9	MilliQ	8.60	10.74
	8	Ablauf	10.03	12.53
<b>Levofloxacin</b>	3-4	MilliQ	15.88	18.27
	6-7	MilliQ	25.58	29.44
	8-9	MilliQ	21.93	25.23
	8	Ablauf	38.38	44.15
<b>Lomefloxacin</b>	3-4	MilliQ	5.40	8.36
	6-7	MilliQ	1.09	1.68
	8-9	MilliQ	1.22	1.89
	8	Ablauf	2.09	3.24

Bei Lomefloxacin reicht eine Bestrahlung von 10 min aus, um eine Wirksamkeit unabhängig von pH-Wert und Wasserart gegen die untersuchten Mikroorganismen *Ps. fluorescens* und *B. subtilis* auszuschließen. Bei den anderen untersuchten Fluorchinolone muss eine deutlich längere Bestrahlungszeit angewendet werden, um eine mögliche Ökotoxizität auszuschließen. Bei Levofloxacin führte eine Bestrahlungszeit von rund 30 min zum Verlust der Wirksamkeit in MilliQ-Wasser und 45 min im Kläranlagenablauf.

Diese Analyse zeigt jedoch nicht, ob die entstandenen Produkte weniger toxisch oder toxischer als ihre Ausgangssubstanz sind. Da die Synthese der Produkte sehr aufwendig

ist und keine entsprechenden Standards erhältlich waren, ist es sehr schwierig, Wirksamkeit und mutmaßliche Ökotoxizität der Photodegradationsprodukte direkt zu bestimmen. Einen Lösungsansatz stellt die in Kap. 2.5 beschriebene QSAR-Analyse dar. Diese Analyse wurde auf Basis der chemischen Strukturen der Produkte der Fluorchinolone durchgeführt, siehe Tab 4.16.

**Tab. 4.16** QSAR-Analyse der Photodegradationsprodukte der Fluorchinolone mit ungefährlicheren (grün) und gefährlicherer Photoprodukten (rot) im Vergleich zur Ausgangssubstanz. Die Photoprodukte werden über ihre m/z-Werte angegeben. Die Wirksamkeit der Substanzen gegen die Organismen wird als Konzentration angegeben.

Substanz	<i>Daphnia magna</i> LC <sub>50</sub> (48 h) mg/L <sup>a</sup>	Fathead minnow LC <sub>50</sub> (96 h) mg/L <sup>a</sup>	Fathead minnow LC <sub>50</sub> (96 h) mg/L <sup>b,c</sup>	Actinopterygii LC <sub>50</sub> (96 h) mg/L <sup>b,d</sup>	Branchiopoda LC <sub>50</sub> (48 h) mg/L <sup>b,d</sup>
<b>Enoxacin</b>	30.03	1.46	5.99E2	2.26E7	1.61E3
<b>293</b>	9.55	2.51	2.01E3	4.13E8	6.26E3
<b>295</b>	5.00	2.65	1.86E3	2.78E8	5.19E3
<b>305</b>	23.06	2.83	3.18E3	6.25E8	7.82E3
<b>307</b>	11.03	4.07	1.07E3	8.87E7	3.04E3
<b>319</b>	33.27	1.72	1.83E3	1.59E8	4.13E3
<b>335</b>	28.08	3.95	1.44E4	1.41E10	3.72E4
<b>Levofloxacin</b>	24.33	0.56	7.31E2	2.48E7	1.79E3
<b>280</b>	2.79	0.66	1.69E2	2.49E6	-
<b>310</b>	11.49	1.53	7.51E3	6.08E9	2.32E4
<b>322</b>	16.47	1.09	4.24E3	1.73E9	1.29E4
<b>334</b>	22.46	0.72	7.86E3	3.29E9	1.79E4
<b>338</b>	58.16	20.6	4.65E1	-	1.01E2
<b>348</b>	25.09	0.70	1.52E3	1.40E8	3.97E3
<b>360</b>	38.89	0.29	2.95E3	5.63E8	7.93E3
<b>364</b>	16.36	0.95	9.53E2	5.85E7	2.66E3
<b>376</b>	21.74	1.92	2.28E4	4.98E10	7.13E4
<b>378</b>	52.94	1.15	9.24E3	7.06E9	2.77E4
<b>394</b>	40.06	1.35	4.24E4	1.91E11	1.40E5
<b>Lomefloxacin</b>	7.87	0.42	3.15E2	2.51E6	8.52E2
<b>294</b>	9.62	1.95	2.77E3	3.69E8	9.94E3
<b>300</b>	63.58	2.10	1.76E3	1.12E8	3.37E3
<b>304</b>	24.82	3.16	7.80E3	3.83E9	1.88E4
<b>308</b>	9.80	1.50	1.54E3	1.15E8	3.46E3
<b>322</b>	15.04	1.39	2.97E3	7.20E8	8.61E3
<b>324</b>	4.28	0.40	1.09E3	1.02E8	3.35E3

---

332	16.38	0.70	5.00E2	1.07E7	1.14E3
346a	17.20	0.63	4.73E3	1.03E9	1.06E4
346b	13.67	0.22	9.50E2	3.44E7	2.05E3
348a	12.18	0.44	1.44E3	1.46E8	4.14E3
348b	17.07	0.90	2.62E3	2.76E8	5.63E3
350a	13.05	0.70	8.78E2	3.91E7	2.19E3
350b	15.62	0.36	9.06E2	3.91E7	2.19E3
350c	15.95	0.69	5.21E2	1.13E7	1.20E3
364a	9.46	0.67	1.51E3	1.22E8	3.87E3
364b	15.67	0.78	8.52E3	3.64E9	2.01E4
368	10.75	0.42	3.73E2	6.69E6	9.55E2

---

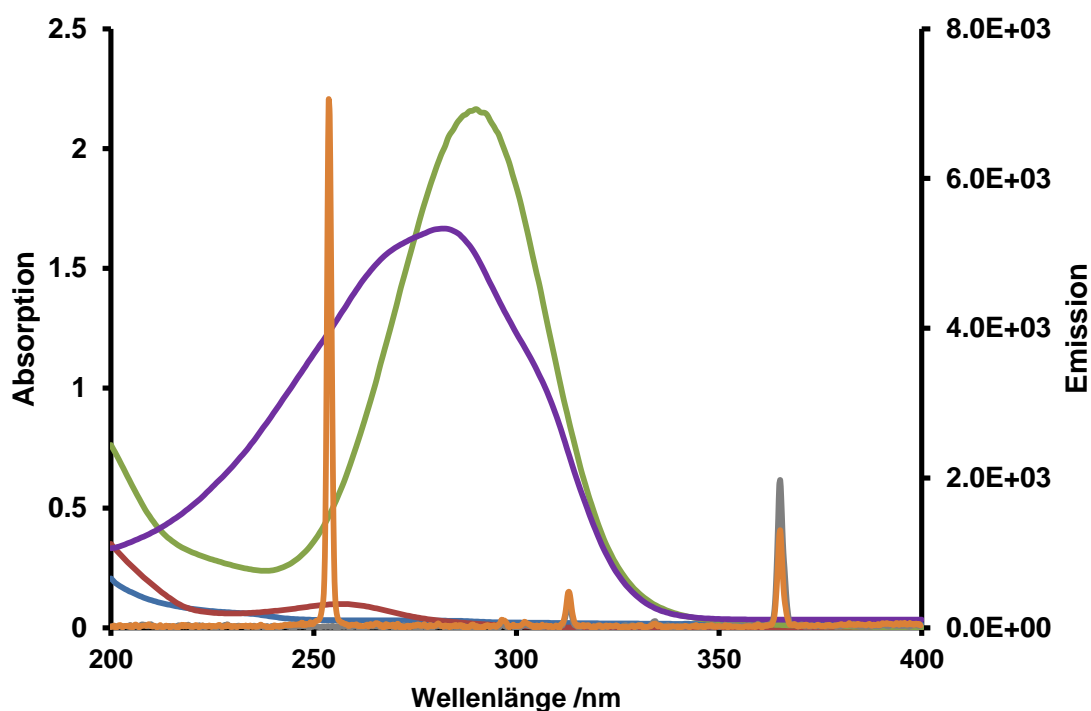
<sup>a</sup> T.E.S.T<sup>b</sup> QSAR Toolbox<sup>c</sup> Pimephales promelas<sup>d</sup> undef. Testorganismen

Die meisten Substanzen, die durch UV-Bestrahlung entstanden sind und in dieser Arbeit nachgewiesen wurden, werden von den QSAR-Methoden als weniger toxisch eingestuft. Dies war zu erwarten, da die Gruppen, die für die Wirksamkeit der Fluorchinolone verantwortlich sind, durch den photoinduzierten Abbau zerstört wurden. Unterschiede bei der QSAR-Analyse zeigten sich bei Verwendung der verschiedenen Programme. Mittels der QSAR-Toolbox konnten keine Werte für *Daphnia magna* ermittelt werden. Ein direkter Vergleich kann bei der fettköpfigen Elritze (Fathead minnow) vorgenommen werden. Hier unterscheiden sich die Werte um mehrere Zehnerpotenzen und die Toxizität wurde für mehrere Produkte bzw. Strukturen unterschiedlich vorhergesagt. Dies könnte daran liegen, dass die beiden verwendeten Programme auf unterschiedliche Datenbanken und Kalibrationsmodelle zurückgreifen. Somit sind Ausgangsparameter und Kalkulationsverfahren verschieden. Die Kalkulation der t.e.s.t. Software basiert auf die Datenbank von EUCAST, während bei der QSAR-Toolbox die Kalkulation basierend auf den Daten der European Chemicals Bureau beruhen. Eine Literatursuche zu Referenzdaten blieb erfolglos. Trotz der unterschiedlichen absoluten Werte stimmen beide Prognosen überein, wenn auf den Ausgangswirkstoff referenziert wird. Die Photoproducte werden in den meisten Fällen als potentiell weniger toxisch vorhergesagt. Eine alternative Methode zur Vorhersage besteht in der Anwendung der MHK-Werte, siehe Kap. 4.3.1.

## 4.4 Makrolide

Nach den Fluorchinolonen wurden die Makrolide untersucht. Besonderheiten bei den Makroliden ist die unterschiedliche UV-Reaktivität der untersuchten Makrolide, die Einfluss auf die Photodegradation haben kann. Die Struktur gibt einen Anhaltspunkt, ob eine Substanz stark oder schwach UV-reaktiv ist, also durch UV-Strahlung angeregt wird und damit Reaktionen mit Molekülen in ihrer Umgebung eingeht. Besitzt das Molekül beispielsweise ein konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem, kann davon ausgegangen werden, dass diese Substanz gut Photonen absorbieren kann. Im UV/Vis-Spektrum finden sich entsprechende Absorptionsbanden.

Ein Vergleich der Absorptionsspektren von Azithromycin, Erythromycin, Spiramycin und Tylosin zusammen mit den charakteristischen Emissionswellenlängen der verwendeten UV-Lampen ist in Abb. 4.15 abgebildet.



**Abb. 4.15** Absorptionsspektren von 30.5 mg/L Azithromycin (blau), 80 mg/L Erythromycin (rot), 5.1 mg/L Spiramycin (lila) und 52.5 mg/L Tylosin (hellgrün) in MilliQ-Wasser bei pH 9. Emissionsspektren der UVA-Lampe (grau) und der UVC-Lampe (orange).

Hierin ist zu erkennen, dass die beiden Makrolide Azithromycin und Erythromycin keine starke Absorption bei den emittierten Wellenlängen besitzen. So wird erwartet, dass die Photoreaktivität dieser beiden Substanzen gering ist. Im Vergleich dazu werden die Makrolide Spiramycin und Tylosin photoreaktiver sein, da sie starke Absorptionsbanden um 280 nm aufweisen und somit Licht zwischen 200 und 350 nm absorbieren.

Azithromycin und Erythromycin besitzen an der Estergruppe  $\pi$ -Elektronenpaare, die einen verbotenen  $n\text{-}\pi^*$  Übergang unter Bestrahlung entsprechender Wellenlänge zeigen. Dieser ist wegen des Verbotes intensitätsschwach. Somit wird geringe Photoreaktivität erwartet. Spiramycin und Tylosin dagegen haben ein konjugiertes  $\pi$ -System, das zu einem energetisch günstigeren  $\pi\text{-}\pi^*$ -Übergang in der Lage ist. Dieser Übergang ist verantwortlich für die starke Absorptionsbande im UV/Vis-Spektrum. Jedoch darf nicht davon ausgegangen werden, dass jedes absorbierte Photon zu einer Reaktion auslösende Anregung führt. Dies wird durch die Quanteneffizienz reflektiert.

Azithromycin und Erythromycin werden hauptsächlich von OH-Radikalen, die aus dem Wasser gebildet werden, abgebaut. Spiramycin und Tylosin dagegen werden neben OH-Radikalmechanismus auch aufgrund eigener Photoreaktivität abgebaut. Zur Bestätigung dieser Aussage wird die Bestimmung der Quantenausbeute und der Quanteneffizienz nach Gleichung 2.30 herangezogen. Zunächst werden jedoch die Geschwindigkeitskonstanten der Abbauprobe bestimmt werden. Dies wird in Kapitel 4.4.1 beschrieben.

#### **4.4.1 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Photoreaktionen von Makroliden**

Tabelle 4.17 zeigt die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung der Abbauprobe unter UVC-Bestrahlung. Diese Untersuchung repräsentiert eine Variation von pH-Werten. Makrolide sind säureempfindlich. Daher soll hier geprüft werden, ob Makrolide im sauren Milieu schneller abgebaut werden. Auch wurde hier die Quanteneffizienz bei 254 nm bestimmt, da die untersuchten Makroliden unterschiedlich starke Photoreaktivität aufweisen.

**Tab. 4.17** Überblick über die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten, Halbwertszeiten und die berechneten Quanteneffizienzen der einzelnen Makrolide bei pH 3, pH 7 und pH 9

pH-Wert	Substanz	$k$ [min <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]	$\Phi_{254}$
<b>pH 3</b>	Azi A	0.47	1.49	1.22
	Azi B	0.69	1.01	1.80
	Ery A	0.10	6.81	0.09
	Ery B	0.05	14.23	0.05
	Ery A – H <sub>2</sub> Oa	0.11	6.53	0.10
	Ery A – H <sub>2</sub> Ob	0.15	4.76	0.14
	Spi I	0.80	0.87	0.05
	Spi III	0.77	0.90	0.05
	Tyl A	2.46	0.28	0.04
	Tyl B	1.43	0.48	0.02
<b>pH 7</b>	Azi A	0.39	1.80	1.02
	Azi B	0.31	2.23	0.81
	Ery A	0.59	1.18	0.55
	Ery B	0.66	1.04	0.61
	Ery A – H <sub>2</sub> Oa	0.59	1.17	0.55
	Ery A – H <sub>2</sub> Ob	1.11	0.63	1.03
	Spi I	0.62	1.12	0.05
	Spi III	0.64	1.08	0.05
	Tyl A	2.47	0.28	0.04
	Tyl B	1.66	0.42	0.03
<b>pH 9</b>	Azi A	0.19	3.67	0.49
	Azi B	0.28	2.52	0.73
	Ery A	0.21	3.37	0.19
	Ery B	0.22	3.21	0.20
	Ery A – H <sub>2</sub> Oa	0.19	3.72	0.18
	Ery A – H <sub>2</sub> Ob	0.21	3.35	0.19
	Spi I	0.66	1.05	0.04
	Spi III	0.54	1.28	0.04
	Tyl A	1.24	0.56	0.02
	Tyl B	0.67	1.03	0.01

Bei Azithromycin A und Azithromycin B konnte der langsamste Abbau bei pH 9 beobachtet werden und der schnellste Abbau erfolgte bei pH 3. Azithromycin B wurde auch schneller abgebaut als Azithromycin A. Besonderheit bei dieser Substanz ist der



Wert der Quanteneffizienz. Dieser war größer als 1. Das bedeutet, dass die Substanz durch andere Mechanismen als die Photodegradation der Substanz abgebaut wird<sup>190</sup>. Beim zweiten Mechanismus handelt es sich um Abbau durch OH-Radikale, die aus Wasser durch UVC-Bestrahlung entstehen.

Bei Erythromycin A konnte der schnellste Abbau bei pH 7 beobachtet werden und der langsamste bei pH 3. Bei pH 3 waren vorwiegend die beiden Dehydroerythromycinspezies von A vorhanden, so dass diese bevorzugt abgebaut wurden. Somit wurde hier bei Erythromycin die geringste Geschwindigkeit beobachtet. Die berechneten Quanteneffizienzen erreichen hier nicht wie bei Azithromycin einen Wert über 1, außer bei pH 7. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass der Abbau zusätzlich durch OH-Radikale stattfand.

Am schnellsten wurde Spiramycin bei pH 3, am langsamsten bei pH 9 abgebaut. Ein Abbau von Spiramycin I und Spiramycin III konnte innerhalb von 6 min erzielt werden. Die Quanteneffizienzen von Spiramycin zeigten Werte deutlich unter 1. Es liegt nahe, dass bei Spiramycin im Wesentlichen die photoinduzierte Degradation eine Rolle spielt.

Tylosin degradierte bei allen drei untersuchten pH-Werten allgemein deutlich schneller als Azithromycin und Erythromycin. Tylosin A wurde dabei schneller als Tylosin B abgebaut. Dies liegt daran, dass aus Tylosin A Tylosin B entsteht, indem das Zuckermolekül Cladinose von Tylosin A abgespalten wird. Die Quanteneffizienz bei Tylosin ist um eine 10er Potenz geringer als bei Azithromycin und Erythromycin.

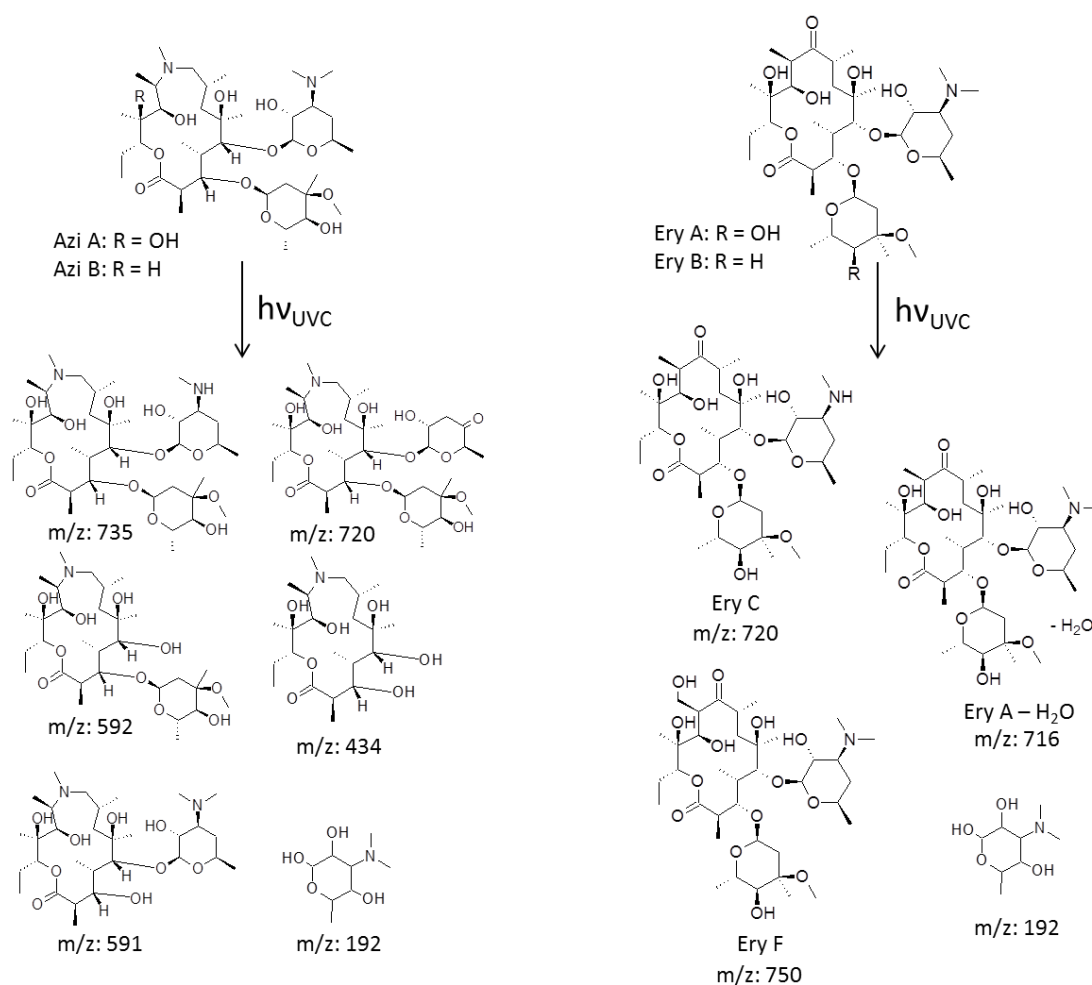
Allgemein kann gesagt werden, dass die Photodegradation von Azithromycin und Erythromycin von OH-Radikalen bestimmt werden. Bei Spiramycin und Tylosin dagegen wird der Abbau zusätzlich durch die eigene Photoreaktivität bestimmt. Dies lässt sich durch einen Vergleich mit den Absorptionsspektren verdeutlichen, siehe Abb. 4.15. Azithromycin und Erythromycin sind UV-schwache Substanzen, so dass diese Substanzen keine UV-Strahlen absorbieren, die nötig sind, um diese Substanzen direkt durch UV-Bestrahlung abzubauen. Hierbei erfolgt der Abbau nur durch OH-Radikale, weshalb auch die Quanteneffizienz bei 1 liegt. Spiramycin und Tylosin absorbieren die

UV-Strahlen sehr stark, so dass die UV-Bestrahlung direkt zum Abbau der Substanzen führen kann.

#### **4.4.2 Analyse der identifizierten Photodegradanten**

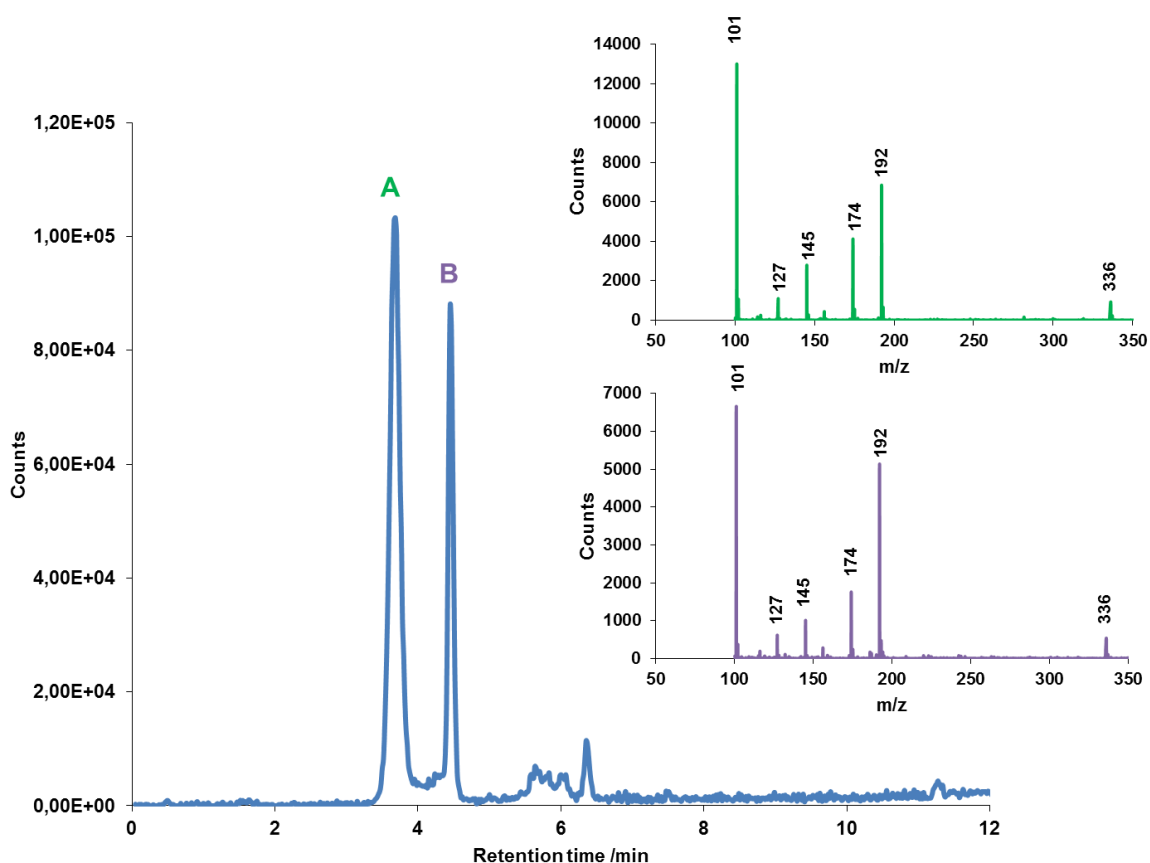
In dieser Arbeit konnten Photodegradanten für Azithromycin mit m/z-Werten der Quasimoleküle von 735, 720, 592, 591 und 434 beobachtet und ihre Struktur identifiziert werden. Diese sieben Produkte stimmen mit den Beobachtungen von Tong *et al.* überein<sup>55</sup>. Darüber hinaus wurde ein weiteres Produkt mit einem m/z-Wert von 192 identifiziert, siehe Abb. 4.16.

Bei Erythromycin wurden Produkte mit m/z-Werten der Quasimoleküle von 750, 720 und 192 gefunden. Diese Produkte konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Dafür wurden Produkte von Batchu *et al.* mit m/z-Werten der Quasimoleküle von 678, 608, 590 und 429 identifiziert, die in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnten, siehe Abb. 4.16<sup>191</sup>.



**Abb. 4.16** Durch UVC-Bestrahlung entstandene und mittels MS und  $MS^n$  identifizierte Photodegradationsprodukte von Azithromycin und Erythromycin

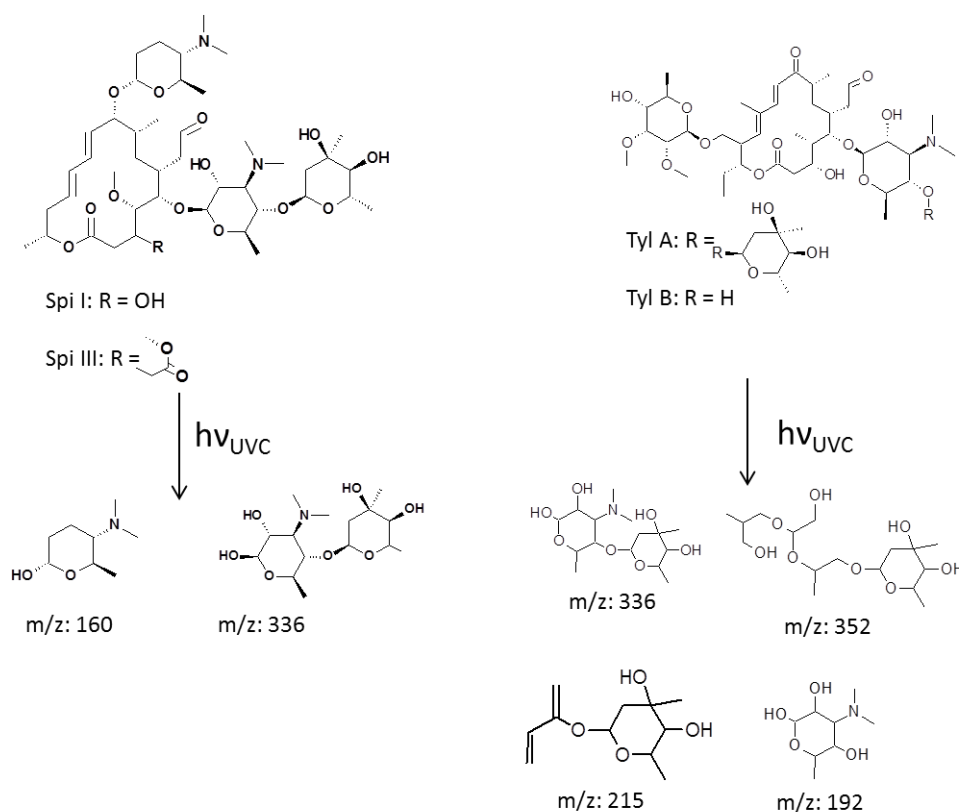
Während der Photodegradation von Spiramycin konnten 3 Produkte identifiziert werden. Die dazugehörigen  $m/z$ -Werte der quasi-Molekülonen sind 160 und 336, wobei zu zwei unterschiedlichen Retentionszeiten im Chromatogramm ein  $m/z$ -Wert von 336 erschien. Die Retentionszeiten betrugen 3.8 und 4.2 min. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um ähnliche Produkte. Eine  $MS^n$ -Analyse ergab, dass gleiche Fragmente erhalten wurden, siehe Abb. 4.17. Im Hinblick auf ihre detektierte Masse gehören die Produkte zu den intermediär auftretenden Degradanten. Ein Strukturvorschlag findet sich in Abb. 4.18. Bei den zwei Strukturen könnte es sich um Diastereoisomere handeln, die hinsichtlich der OH-Gruppe an der Verknüfungsposition zum Lactonring nach Abspaltung vom Lactonring durch radikalische Substitution in *R* oder *S* Konfiguration entstanden sein können.



**Abb. 4.17** EIC der Photodegradationsprodukte mit  $m/z = 336$ , die aus Spiramycin gebildet wurden. Die jeweiligen Fragmente, die durch MS/MS-Versuche erhalten wurden, sind oben rechts dargestellt.

Diese beiden Photoprodukte wurden auch unter UVA-Bestrahlung beobachtet<sup>192</sup>. Des Weiteren wurden in der Studie von Calza *et al.* Produkte beobachtet, die noch den Laktonring aufwiesen, aber nicht in dieser Studie wiedergefunden werden konnten.

Auch der Abbau von Tylosin unter UV-Bestrahlung wurde mehrfach untersucht<sup>37,193,194</sup>. In diesen Studien wurden jedoch keine Photodegradationsprodukte beschrieben. In dieser Arbeit wurden Zucker als Abbauprodukte gefunden. Die dazugehörigen  $m/z$ -Werte waren 352, 336, 215 und 192, siehe Abb. 4.18.



**Abb. 4.18** Unter UVC-Bestrahlung identifizierte Photodegradationsprodukte von Spiramycin und Tylosin.

Bezüglich der Produktbildung der Makrolide durch UVC-Bestrahlung können die Makrolide in zwei Klassen eingeteilt werden: einmal die sehr schwach UV-reaktiven Makrolide, wie Azithromycin und Erythromycin, und die stark UV-reaktiven, wie Spiramycin und Tylosin. Bei der Identifizierung ihrer Produkte ist auffällig, dass bei den schwach UV-reaktiven Substanzen Produkte gebildet wurden, in denen der Lactonring noch vorhanden war. Im Vergleich dazu wurden bei Spiramycin und Tylosin lediglich Produkte der Zuckersubstituenten gefunden. Dies beruht vermutlich darauf, dass bei Spiramycin und Tylosin der Anteil, der für die UV-Reaktivität verantwortlich ist, ein konjugiertes  $\pi$ -Elektronen-System im Lactonring ist. Dies reagiert dann unter UVC-Bestrahlung, so dass sich der Ring öffnet und weitere schnellere Reaktionen folgen. Azithromycin und Erythromycin dagegen besitzen kein konjugiertes  $\pi$ -Elektronen-System. Hier kommt lediglich der Abbau durch Hydroxylradikalangriff oder Abspaltung der Zuckermoleküle durch OH-Radikale zustande. Calza *et al.* konnten dennoch bei Spiramycin den Lactonring und Fragmente davon nachweisen<sup>192</sup>. Dies liegt daran, dass sie Spiramycin UVA-Strahlung aussetzten. Wie oben beschrieben handelt es sich hierbei

um eine deutlich schwächere Bestrahlungsmethode, da keine OH-Radikale entstehen. Um diese Aussage zu bestätigen, wurden bei Spiramycin auch Versuche mit UVA-Bestrahlung durchgeführt, die in Kapitel 4.4.3 diskutiert werden. Die beobachteten quasi-Molekülonen sind in Tab. 4.18 dargestellt.

**Tab. 4.18** Beobachtete Degradationsprodukte der Makrolide mit ihren aus MS<sup>2</sup>-Experimenten stammenden Fragmenten sowie Retentionszeiten der Produkte<sup>47,48</sup>

Makrolid	Degrada- tions- produkt	$R_t$ /min	theoretisch [M+H] <sup>+</sup>	beobachtete [M+H] <sup>+</sup>	Fragmente
<b>Azithromycin</b>	192	0.5	192.123	192.126	-
	591	4.8	591.422	591.427	434.315; 296.217
	434	5.2	434.312	434.315	-
	735	5.4	735.500	735.506	591.426; 368.257
	592	8.5	592.406	592.408	300.278; 237.102
	720	8.8	720.453	720.462	540.308; 375.266; 250.994
<b>Erythromycin</b>	192	0.6	192.123	192.123	-
	720	7.5	720.452	720.457	558.366; 460.414; 375.263
<b>Spiramycin</b>	160	0.6	160.133	160.134	142.123
	322	3.2	322.186	322.185	118.086
	336 a	3.7	336.202	336.204	192.122; 174.111; 145.084; 127.074; 101.059
	336 b	4.4	336.202	336.204	192.122; 174.111; 145.084; 127.074; 101.059
<b>Tylosin</b>	192	1.1	192.123	192.123	-
	215	1.8	215.128	215.090	-
	352	3.7		352.196	-
	336	4.2	336.202	336.201	-

Diese Abbauprodukte können nach Folge-Reaktion, Gleichung 2.22, oder nach Folge-Folge-Reaktion, Gleichung 2.24, mathematisch modelliert werden. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten und die daraus resultierenden Halbwertszeiten der Abbauprodukte von Azithromycin, Erythromycin, Spiramycin und Tylosin sind in Tabelle 4.19 dargestellt.

**Tab. 4.19** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der identifizierten Degradationsprodukte (DP) von Azithromycin (Azi), Erythromycin (Ery), Spiramycin (Spi) und Tylosin (Tyl) bei pH 3, pH 7 und pH 9

pH-Wert	Produkt	$k_1$ /min <sup>-1</sup>	$k_2$ /min <sup>-1</sup>	$k_3$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min ( $k_1$ )	$t_{1/2}$ /min ( $k_2$ )	$t_{1/2}$ /min ( $k_3$ )
pH 3	DPAzi735	< 0.01	0.20	-	446,33	3.42	-
	DPAzi720	nicht beobachtet			-	-	-
	DPAzi592	0.59	0.55	4.08	1.17	1.27	0.17
	DPAzi591	0.68	0.70	6.37	1.03	0.99	0.11
	DPAzi434	0.83	0.83	0.34	0.83	0.83	2.05
	DPAzi192	0.25	0.09	1.95	2.73	7.84	0.36
	Ery F	nicht beobachtet			-	-	-
	Ery C	nicht beobachtet			-	-	-
	DPEry192	0.35*	-	-	1.97	-	-
	DPSpi336a	0.35	0.43	0.55	2.00	1.60	0.55
	DPSpi336b	0.21	0.52	0.61	3.29	1.33	0.61
	DPSpi160	0.67	0.14	-	1.04	5.01	-
	DPTyl192	0.16	0.39	-	4.26	1.80	-
	DPTyl336	0.12	0.12	-	5.95	5.96	-
	DPTyl352	0.17*	-	-	4.09	-	-
	DPTyl215	0.19	0.78	3.06	3.56	0.89	0.23
pH 7	DPAzi735	< 0.01	0.20	-	205.13	3.46	-
	DPAzi720	< 0.01	0.47	-	199.58	1.47	-
	DPAzi592	0.03	2.02	0.52	22.53	0.34	1.34
	DPAzi591	nicht beobachtet			-	-	-
	DPAzi434	0.01	1.84	0.12	76.67	0.38	5.92
	DPAzi192	< 0.01	0.51	-	293.58	1.37	-
	Ery F	0.89	0.35	-	0.78	1.98	-
	Ery C	0.74	5.27	0.78	0.94	0.13	0.89
	DPEry192	nicht beobachtet			-	-	-
	DPSpi336a	0.29	0.30	1.26	2.40	2.35	0.55
	DPSpi336b	0.99	0.21	0.21	0.70	3.33	3.31
	DPSpi160	0.64	0.07	-	1.08	10.49	-
	DPTyl192	0.24	0.24	-	2.85	2.94	-
	DPTyl336	0.41	0.41	2.36	1.69	1.69	0.29

	<b>DPTyl352</b>	0.31	2.14	0.31	2.23	0.32	2.23
	<b>DPTyl215</b>	0.88	0.85	0.84	0.79	0.82	0.82
<b>pH 9</b>	<b>DPAzi735</b>	0.38	0.37	4.70	1.84	1.88	0.15
	<b>DPAzi720</b>	0.28	0.12	1.74	2.45	5.60	0.40
	<b>DPAzi592</b>	0.08	1.79	0.49	9.10	0.39	1.41
	<b>DPAzi591</b>	nicht beobachtet			-	-	-
	<b>DPAzi434</b>	2.15	0.01	0.28	0.32	53.73	2.52
	<b>DPAzi192</b>	0.02	0.30	5.07	29.53	2.34	0.14
	<b>Ery F</b>	1.09*			0.64	-	-
	<b>Ery C</b>	0.17	0.18		4.04	3.92	-
	<b>DPEry192</b>	0.30*			2.34	-	-
	<b>DPSpi336a</b>	nicht beobachtet			-	-	-
	<b>DPSpi336b</b>	nicht beobachtet			-	-	-
	<b>DPSpi160</b>	0.93	0.04	-	0.74	16.39	-
	<b>DPTyl192</b>	nicht beobachtet			-	-	-
	<b>DPTyl336</b>	nicht beobachtet			-	-	-
	<b>DPTyl352</b>	0.34	0.36	-	2.02	1.93	-
	<b>DPTyl215</b>	0.02	0.29	-	38.85	2.40	-

\* Kein Abbau beobachtet

Das Degradationsprodukt von Azithromycin mit  $m/z = 735$  wurde im Sauren langsamer gebildet als im Basischen. Das gleiche konnte auch bei dem Photodegradant mit  $m/z = 720$  beobachtet werden. Diese beiden Produkte wurden durch Transformation des Desosamin-Zuckers gebildet. Das Produkt mit  $m/z = 735$  wurde am Stickstoff demethyliert. Bei dem Produkt mit  $m/z = 720$  wurde ein Wasserstoffatom durch eine Hydroxylgruppe substituiert, gefolgt von der Eliminierung der Dimethylaminogruppe, was über eine Keto-Enol-Tautomerie zu einer Ketogruppe führte. Die zwei Degradationsprodukte mit  $m/z = 591$  und  $m/z = 592$  verloren jeweils ein glykosidisch gebundenes Zuckermolekül. Die Abspaltung beider glykosidisch gebundener Zuckermoleküle führte zum Degradationsprodukt mit  $m/z = 434$ . Aus den kinetischen Daten konnte aber kein Zusammenhang in der Reihenfolge der Bildung und des Abbaus dieser drei Photodegradationsprodukte identifiziert werden. Diese gebildeten Degradationsprodukte besitzen noch glykosidisch gebundene Zuckermoleküle am Lactonring. Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese Substanzen noch antibiotisch oder pharmazeutisch aktiv sein könnten. Die meisten Photodegradanten von Azithromycin bildeten sich im Sauren am schnellsten und wurden auch hierbei am



schnellsten wieder abgebaut. Somit ist für die photoinduzierte Degradation bei pH 3 der optimale pH-Bereich für einen schnellen Degradationsprozess.

Bei der photoinduzierten Degradation von Erythromycin trat bei pH 7 und pH 9 ein Abbauprodukt mit  $m/z = 720$  auf, welches als Erythromycin C identifiziert werden konnte. Ein weiteres Abbauprodukt mit dem  $m/z = 750$  wurde beobachtet. Diese Masse entspricht Erythromycin F, allerdings wurde dieses Produkt bei einer anderen Retentionszeit beobachtet, so dass es sich hierbei um ein Isomer von Erythromycin F handelt. Alle hier diskutierten Photoprodukte von Erythromycin könnten aufgrund des intakten Makrolidrings noch eine antibiotische Wirkung zeigen.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Abbauprodukte von Spiramycin konnten vollständig für pH 3 und 7 bestimmt werden. Bei pH 9 konnte nur die Konzentrations-Zeit Kurve für das Produkt mit  $m/z = 160$  mathematisch modelliert werden. Hierbei konnte kein Trend bezüglich der pH-Werte beobachtet werden.

Der Abbau der gebildeten Phototransformationsprodukte von Tylosin mit  $m/z = 192$ ,  $m/z = 336$ ,  $m/z = 352$  und  $m/z = 215$  war bei pH 7 am schnellsten. Bei pH 3 und pH 9 konnte ein deutlich langsamer Degradationsprozess beobachtet werden.

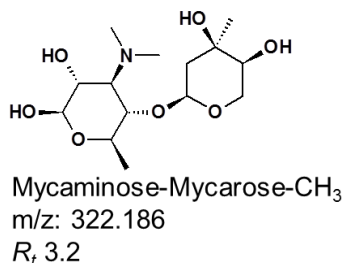
#### **4.4.3 Einfluss von gelöstem Sauerstoff am Beispiel von Spiramycin**

Der Einfluss von gelöstem Sauerstoff auf die photoinduzierte Degradation von Makroliden wurde am Beispiel von Spiramycin untersucht. Alle bestimmten Geschwindigkeitskonstanten von Spiramycin und dessen Abbauprodukte sind in Tabelle 4.20 aufgeführt.

**Tab 4.20** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten von Spiramycin I und Spiramycin III und deren photoinduzierten Abbauprodukte bei pH 3-4, 6-7 und 8-9 unter Sauerstoffanwesenheit und -abwesenheit

Substanz (m/z- value)	pH- Wert	Sauerstoff	$k_1$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k_2$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k_3$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min
<b>Spi I</b>	3-4	ja	0.80	0.87				
<b>Spi I</b>	3-4	nein	1.44	0.48				
<b>Spi III</b>	3-4	ja	0.77	0.90				
<b>Spi III</b>	3-4	nein	0.75	0.92				
<b>160</b>	3-4	ja	0.67	1.04	0.14	5.01		
<b>160</b>	3-4	nein	1.33	0.52	0.05	14.63		
<b>336a</b>	3-4	ja	0.35	2.00	0.43	1.60	0.55	1.26
<b>336a</b>	3-4	nein	0.57	1.22	0.12	6.00	0.56	1.24
<b>336b</b>	3-4	ja	0.21	3.29	0.52	1.33	0.61	1.14
<b>336b</b>	3-4	nein	0.58	1.19	0.58	1.19	0.10	7.19
<b>Spi I</b>	6-7	ja	0.62	1.12				
<b>Spi I</b>	6-7	nein	1.18	0.59				
<b>Spi III</b>	6-7	ja	0.64	1.08				
<b>Spi III</b>	6-7	nein	0.67	1.03				
<b>160</b>	6-7	ja	0.64	1.08	0.07	10.49		
<b>160</b>	6-7	nein	1.18	0.59	0.07	10.34		
<b>336a</b>	6-7	ja	0.29	2.40	0.30	2.35	1.26	0.55
<b>336a</b>	6-7	nein	0.34	2.02	0.94	0.74	0.34	2.03
<b>336b</b>	6-7	ja	0.99	0.70	0.21	3.33	0.21	3.31
<b>336b</b>	6-7	nein	0.64	1.08	0.23	3.03	0.61	1.13
<b>Spi I</b>	8-9	ja	0.66	1.05				
<b>Spi I</b>	8-9	nein	1.11	0.62				
<b>Spi III</b>	8-9	ja	0.54	1.28				
<b>Spi III</b>	8-9	nein	0.54	1.29				
<b>160</b>	8-9	ja	0.93	0.74	0.04	16.39		
<b>160</b>	8-9	nein	1.15	0.60	0.06	12.21		
<b>336a</b>	8-9	ja	-	-	-	-	-	-
<b>336a</b>	8-9	nein	0.93	0.74	0.18	3.96	0.95	0.73
<b>336b</b>	8-9	ja	-	-	-	-	-	-
<b>336b</b>	8-9	nein	1.01	0.68	0.11	6.49	1.01	0.69
<b>322</b>	3-4	nein	0.31	2.23	0.31	2.24	0.23	3.00
<b>322</b>	6-7	nein	0.59	1.17	0.59	1.17	0.24	2.93
<b>322</b>	8-9	nein	0.45	1.52	0.20	3.47	0.50	1.39

Unter Sauerstoffabwesenheit konnte ein weiteres Photodegradationsprodukt mit  $m/z = 322$  identifiziert werden. Dieses Degradationsprodukt ist in Abb. 4.19 dargestellt.



**Abb. 4.19** Degradationsprodukt von Spiramycin, das unter UVC-Bestrahlung und Sauerstoffabwesenheit bei pH 3-4, pH 6-7 und pH 8-9 entstanden ist

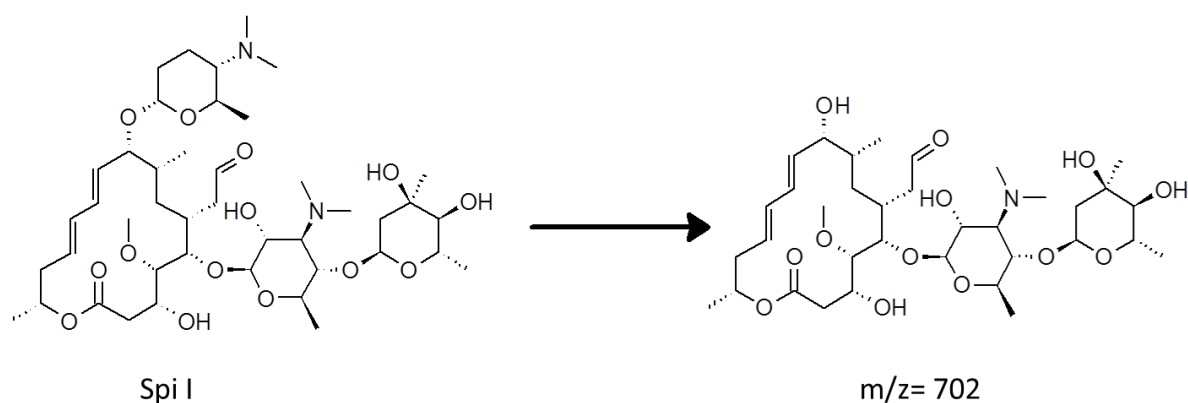
Dieses Produkt konnte als eines der glykosidisch gebundenes Zuckermolekül beschrieben werden und wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Das Degradationsprodukt mit  $m/z = 160$  konnte immer als Zwischenprodukt einer Folge-Reaktion, Gleichung 2.22, beschrieben werden. Die anderen Photodegradationsprodukte konnten als Zwischenprodukte einer Folge-Folge-Reaktion, Gleichung 2.24, modelliert werden.

In Abwesenheit von Sauerstoff konnte sowohl bei Spiramycin als auch bei den Abbauprodukten eine Beschleunigung des Abbaus erreicht werden. Der pH-Wert spielt hier eine untergeordnete Rolle und hat keinen signifikanten Einfluss auf den photoinduzierten Abbau. Somit hat hier die Abwesenheit von Sauerstoff einen positiven Einfluss auf die Degradation und Eliminierung der Abbauprodukte aus Wässern.

#### 4.4.4 Vergleich der durch UVA- und UVC-Bestrahlung induzierten Photodegradation der Makrolide

Durch UVA-Bestrahlung konnten die gleichen Produkte in Lösung identifiziert werden wie durch UVC-Bestrahlung, allerdings konnte hierbei kein Abbau der Produkte gefunden werden. Die identifizierten Produkte wurden schon vor Bestrahlung aufgefunden. Hierbei handelt es sich um säureinduzierte Degradation, wie sie schon mehrmals in dieser Arbeit beschrieben wurde.

Die UVA-Bestrahlungsexperimente an Spiramycin führten zu einem sehr geringen Abbau, so dass eine mathematische Anpassung der Daten nach einem kinetischen Modell erster Ordnung nicht zu sinnvollen Resultaten führte. Es entstanden die gleichen Produkte wie bei UVC-Bestrahlung. Allerdings bildeten sich diese Photodegradationsprodukte, bedingt durch den langsamen Abbau, deutlich später, so dass auch hier auf die mathematische Modellierung verzichtet wurde. Unter UVA-Bestrahlung wurde ein weiteres Produkt identifiziert, das einen  $m/z$ -Wert von 702 aufwies, siehe Abb. 4.20.



**Abb. 4.20** Photodegradationsproduktbildung mit  $m/z = 702$  aus Spiramycin I durch UVA-Bestrahlung

Hier konnte ein intakter Lacton-Ring gefunden werden, was bestätigt, dass UVA-Bestrahlung ein milderes Verfahren darstellt. Außerdem wurden keine OH-Radikale durch Wasserspaltung gebildet. Dadurch verlief der Abbau deutlich langsamer, der Lacton-Ring blieb intakt. Photodegradationsprodukte entstanden deutlich später. Bei dem Produkt mit  $m/z = 702$  handelt es sich um das von Calza *et al.* beschriebene, durch UVA-Bestrahlung entstandene Produkt<sup>192</sup>.

Bei Tylosin verlief der Abbau unter UVA-Bestrahlung ebenfalls deutlich langsamer. Eine vergleichende Übersicht über Abbauraten und zugehörigen Halbwertszeiten ist von Tylosin A und Tylosin B in Tab. 4.21 widergegeben.

**Tab. 4.21** Geschwindigkeitskonstanten und daraus resultierenden Halbwertszeiten von Tylosin A und Tylosin B unter UVA- und UVC-Bestrahlung.

Substanz	pH-Wert	Strahlung	$k / \text{min}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{min}$
Tyl A	3	UVA	0.10	6.93
		UVC	2.46	0.28
Tyl B		UVA	0.15	4.62
		UVC	1.43	0.48
Tyl A	7	UVA	0.12	5.78
		UVC	0.14	4.95
Tyl B		UVA	2.47	0.28
		UVC	1.66	0.42
Tyl A	9	UVA	0.14	4.95
		UVC	1.24	0.56
Tyl B		UVA	0.17	4.08
		UVC	0.67	1.03

Nach UVA-Bestrahlung konnten Produkte mit m/z-Werten von 336 und 192 identifiziert werden. Bei UVC-Bestrahlung konnten die beiden Produkte ebenfalls gefunden werden, außerdem noch zwei weitere Produkte mit m/z-Werten von 352 und 215. Produkte, die einen Lactonring aufwiesen, konnten nicht unter UVA- Bestrahlung gefunden werden.

Es zeigte sich, dass die effektivere Bestrahlungsmethode für den Abbau der Makrolide die Verwendung von UVC-Strahlung ist.

#### **4.4.5 Einfluss von $\text{TiO}_2$ auf den Azithromycin-Abbau unter UVA-Bestrahlung**

Anhand von Azithromycin A, einer schwach UV-reaktiven Substanz, soll nun der Einfluss von  $\text{TiO}_2$  beschrieben werden. Dabei wurden zwei verschiedene  $\text{TiO}_2$ -Modifikationen eingesetzt. Der pH-Wert wurde auf pH 3-4 eingestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.22 dargestellt.

**Tab. 4.22**      **Abbau von Azithromycin A bei pH 3-4 in Anwesenheit von TiO<sub>2</sub> bzw. P25 und unter UVA-Bestrahlung**

	$k / \text{min}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{min}$
nur UVA	0.03	23.75
50 mg/L TiO <sub>2</sub>	kein Abbau	
100 mg/L TiO <sub>2</sub>	kein Abbau	
50 mg/L P25	0.30	2.29
100 mg/L P25	0.38	1.84

Wie in Tabelle 4.22 ersichtlich, konnte der Abbau von Azithromycin A unter Zugabe von P25 deutlich beschleunigt werden. Kein Abbau konnte bei Zusatz von gewöhnlichen TiO<sub>2</sub> beobachtet werden. Die Ursache hierfür ist, dass durch Lichtstreuung an TiO<sub>2</sub>-Partikeln die Wechselwirkung zwischen Azithromycin und Strahlung reduziert wird. Andererseits führt die Wechselwirkung der inaktiven TiO<sub>2</sub>-Modifikation mit UVA-Strahlung nicht zur Generierung von Hydroxylradikalen, die dann die Degradation des Azithromycin verursachen.

Jedoch konnte die Zugabe der UV-reaktiveren TiO<sub>2</sub> P25-Modifikation die Abbaugeschwindigkeit nicht soweit erhöhen wie die Verwendung der UVC-Lampe. Die Dispersion des Extinktionskoeffizienten von Azithromycin wies eine geringe Absorption im UVC-Bereich auf. Im UVA-Bereich dagegen wurde keine UV-Absorption beobachtet werden. Daher konnte durch UVC-Bestrahlung durch Erzeugung von Hydroxylradikalen ein schnellerer Abbau erzielt werden.

#### 4.4.6 Beurteilung der Ökotoxizität mittels QSAR

Eine Abschätzung der Ökotoxizität wurde mittels QSAR-Analyse durchgeführt. Die Resultate sind in Tab. 4.23 dargestellt.

**Tab. 4.23** QSAR-Analyse der Photodegradationsprodukte der Makrolide mit ungefährlicheren (grün) und gefährlicherer Photoprodukte (rot) im Vergleich zu der Ausgangssubstanz. Analysiert wurden die Ausgangskonzentrationen der Wirksamkeit gegen die Organismen im Vergleich zu der Konzentration der Wirksamkeit des Photoproduktes

Substanz	<i>Daphnia magna</i> LC50 (48 h) mg/L <sup>a</sup>	Fathead minnow LC50 (96 h) mg/L <sup>a</sup>	Fathead minnow LC50 (96 h) mg/L <sup>b,c</sup>	Branchiopoda LC50 (48 h) mg/L <sup>b,d</sup>
Azi A	80.84	0.33	-	3.04
Azi B	72.43	0.87	-	2.22
735	98.37	0.14	-	3.99
720	202.02	-	-	28.4
592	108.58	0.04	-	23.4
591	151.56	0.10	-	3.26
434	97.23	4.09	695	23.3
192	2067.67	4087.53	1.58E5	1780
Ery A	135.5	-	-	8.6
Ery B	127.65	-	-	0.98
Ery C	193.84	-	340	11.3
Ery F	333.08	-	-	68.4
716	129.61	-	193	6.36
192	2067.67	4087.53	1.58E5	1780
Spi I	69.14	-	-	97
Spi III	15.00	-	-	34.2
336	579.58	410.60	2.69E5	-
322	666.63	547.26	4E5	-
160	367.72	1062.61	1.88E4	-
702	211.54	-	-	703
Tyl A	104.55	-	-	426
Tyl B	76.56	-	-	264
352	347.51	683.37	4.39E4	-
336	579.58	410.60	2.69E5	-
215	90.11	246.51	551	-
192	2067.67	4087.53	1.58E5	1780

<sup>a</sup> T.E.S.T

<sup>b</sup> QSAR Toolbox

<sup>c</sup> Pimephales promelas

<sup>d</sup> undef. Testorganismen

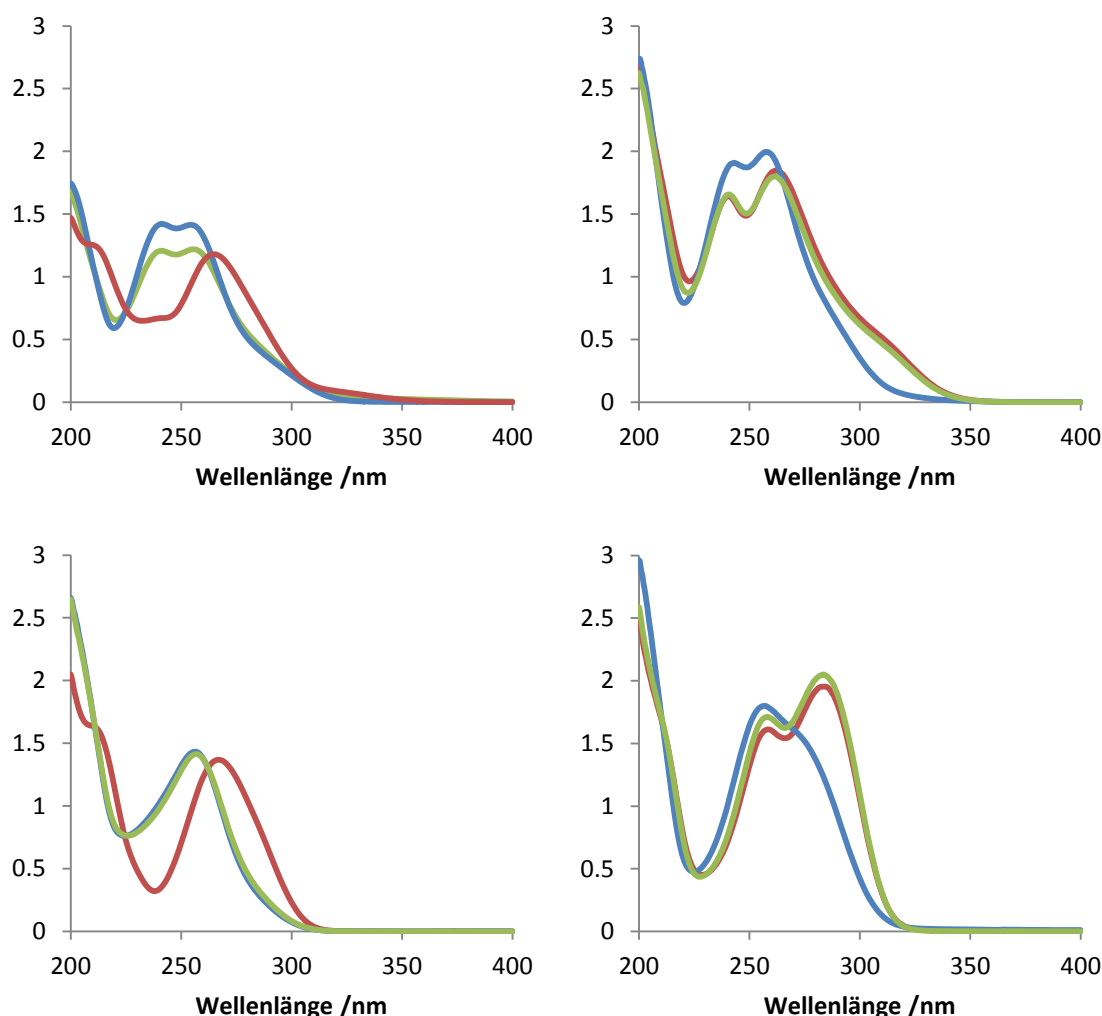
Die QSAR-Analyse lieferte für einige Degradationsprodukte und Organismen keine Vorhersagewerte, so dass ein Vergleich mit der Ausgangssubstanz nicht möglich war. Allgemein lässt sich sagen, dass die Bestrahlung der Substanzen einen positiven Effekt auf die Verminderung der Wirksamkeit der Substanzen hat. Die detektierten Zuckermoleküle sollen der Vorhersage nach im Vergleich zu den Molekülen mit intaktem Lactonring höhere  $LC_{50}$ -Konzentrationen aufweisen, die die Wirksamkeit gegen die untersuchten Mikroorganismen widerspiegeln. Jedoch wurden auch hier für einige Substanzen erhöhte  $LC_{50}$ -Werte vorhergesagt, von denen jedoch keiner in den unteren  $\mu\text{g/L}$  Bereich vordringt, was in Oberflächengewässern gefundenen Konzentrationen entspräche. Die Verwendung unterschiedlicher Software lieferte auch hier unterschiedliche Werte wie zuvor die QSAR-Analyse der Fluorchinolone und ihrer Abbauprodukte.

#### **4.5 Sulfonamide**

In diesem Abschnitt werden die Sulfonamide Sulfadiazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxazol und Sulfathiazol und ihr photoinduzierter Abbau beschrieben. Hierbei wurden pH-Wert,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration und die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Sauerstoff untersucht. Dabei wurde UVC-Strahlung verwendet. Darüber hinaus wurden einige Substanzen auch UVA-Strahlung ausgesetzt. Die Abbauprobe wurden im sauren bei pH 3-4, im neutralen bei pH 6-7 und im basischen Milieu bei pH 8-9 durchgeführt. Die Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  betrugen 10 und 30  $\text{mg/L}$  ebenfalls jeweils bei den drei pH-Wert-Bereichen. Auch wurde der Einfluss der Anwesenheit von Sauerstoff untersucht.

Die Untersuchungen mit UV/Vis-Spektroskopie zeigten anhand der Absorptionsbanden in den erhaltenen Spektren, dass Sulfonamide photoreaktive Substanzen sind, siehe Abb. 4.21.

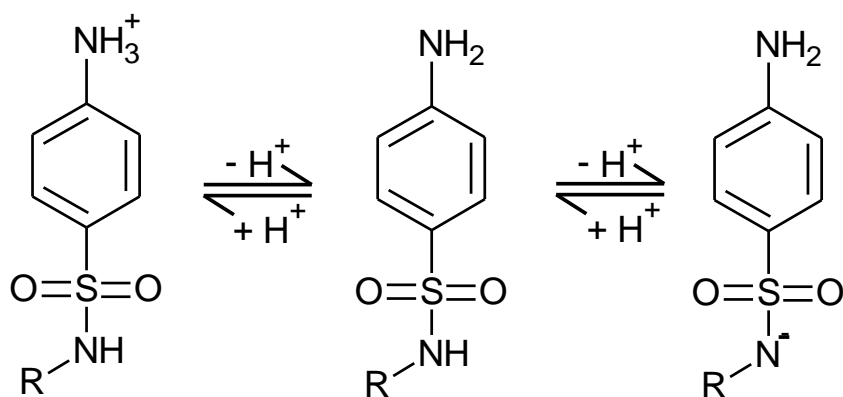




**Abb. 4.21** UV-Vis Spektren von Sulfadiazin (oben links), Sulfamethazin (oben rechts), Sulfamethoxazol (unten links) und Sulfathiazol (unten rechts), bei pH 3-4 (rot), pH 6-7 (grün) und pH 8-9 (blau). Die Konzentrationen der wässrigen Lösung betrugen 50 mg/L.

Interessant bei den Spektren ist, dass bathochrome und hypsochrome Effekte mit Änderung des pH-Wertes beobachtet wurden. Eine Verschiebung des Maximums einer Bande lässt sich bei Sulfamethazin und Sulfamethoxazol erkennen. Bei Sulfamethoxazol verschob sich bei pH 3-4 das Maximum in den höheren Wellenlängenbereich, bei Sulfamethazin verschob sich bei pH 8-9 das Maximum in den niedrigeren Wellenlängenbereich. Bei Sulfadiazin und Sulfathiazol verändern sich die Spektren durch Auftreten bzw. Verschwinden von Banden. So lässt sich bei Sulfadiazin ein starkes Maximum bei pH 3-4 erkennen, bei pH 6-7 und 8-9 sind jeweils zwei Maxima zu sehen. Ähnlich verhielt sich Sulfathiazol. Hier sind bei pH 8-9 eine Bande im Spektrum

erkennbar und bei pH 6-7 und 3-4 jeweils zwei Banden. Ob und inwieweit diese Eigenschaften Auswirkungen auf die Kinetik und der Degradation der Substanzen haben, wird im nächsten Kap. 4.5.1 diskutiert. Die Veränderung der Banden lässt sich wie bei den Fluorchinolonen durch die Tautomerien des Moleküls erklären, die durch die unterschiedlichen pH-Werte hervorgerufen wird, siehe Abb. 4.22.



**Abb. 4.22** Einfluss des pH-Wertes auf die Ladung von Sulfonamiden, saures Milieu (links), neutrales Milieu (mitte), basisches Milieu (rechts)

Photodegradationsprodukte wurden bei Sulfamethoxazol, Sulfadiazin und Sulfamethazin beobachtet. Zunächst soll der Photo-Abbau der einzelnen Sulfonamide in Kapitel 4.5.1 diskutiert werden, danach das Abbauverhalten der Degradanten.

#### 4.5.1 Kinetik der Photodegradation der Sulfonamide

Um die Reihenfolge der Abbaugeschwindigkeiten der vier Sulfonamide unter UVC-Bestrahlung zu bestimmen, wurden zunächst einmal die Geschwindigkeitskonstanten ermittelt, siehe Tabelle 4.24.

Tab. 4.24 Geschwindigkeitskonstanten von Sulfamethoxazol, Sulfadiazin, Sulfamethazin und Sulfathiazol bei unterschiedlichen Bedingungen von langsam bis schnell aufsteigend angeordnet.

Sulfamethoxazol				Sulfadiazin				Sulfamethazin				Sulfathiazol			
pH	O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mg L <sup>-1</sup>	k /min <sup>-1</sup>	pH	O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mg L <sup>-1</sup>	k /min <sup>-1</sup>	pH	O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mg L <sup>-1</sup>	k /min <sup>-1</sup>	pH	O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mg L <sup>-1</sup>	k /min <sup>-1</sup>
3-4	N	0	1.63	3-4	Y	30	0.27	6-7	Y	30	0.34	8-9	Y	0	0.65
6-7	N	0	1.31	6-7	Y	0	0.18	3-4	Y	30	0.29	8-9	Y	10	0.58
3-4	Y	10	1.25	6-7	Y	30	0.17	8-9	Y	30	0.25	8-9	N	0	0.56
3-4	Y	30	1.17	6-7	Y	10	0.15	6-7	Y	10	0.19	8-9	Y	30	0.56
3-4	Y	0	0.90	3-4	Y	0	0.15	3-4	Y	10	0.19	6-7	Y	30	0.45
8-9	N	0	0.86	8-9	Y	30	0.15	8-9	Y	10	0.17	3-4	Y	30	0.42
8-9	Y	30	0.57	3-4	Y	10	0.14	3-4	Y	0	0.16	3-4	Y	10	0.41
6-7	Y	30	0.47	8-9	Y	10	0.13	8-9	Y	0	0.15	3-4	Y	0	0.30
8-9	Y	10	0.47	8-9	Y	0	0.13	8-9	N	0	0.13	6-7	Y	0	0.30
6-7	Y	10	0.47	6-7	N	0	0.11	6-7	N	0	0.10	6-7	Y	10	0.29
6-7	Y	0	0.35	8-9	N	0	0.11	3-4	N	0	0.08	6-7	N	0	0.27
8-9	Y	0	0.35	3-4	N	0	0.08	6-7	Y	0	0.07	3-4	N	0	0.16

Auffällig ist, dass Sulfamethoxazol am schnellsten in Abwesenheit von Sauerstoff abgebaut wurde  $k=1.63 \text{ min}^{-1}$ , danach unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe  $k=1.25 \text{ min}^{-1}$ . Unter diesen Bedingungen sowie bei Sauerstoffanwesenheit wurde Sulfamethoxazol jeweils bei pH 3-4 am schnellsten abgebaut. Am langsamsten baute Sulfamethoxazol bei pH 8-9 mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $0.35 \text{ min}^{-1}$  ab. Dieser Wert wurde bei Sulfadiazin und

Sulfamethazin nicht erreicht. Bei Sulfathiazol erwies sich das basische Milieu als vorteilhaft für einen schnellen Abbau. Im Basischen wurde bei Variation der Bedingungen jeweils der schnellste Abbau erzielt. War bei Sulfamethoxazol der Abbau in Abwesenheit von Sauerstoff am schnellsten, so konnte bei den anderen drei Sulfonamiden der langsamste Abbau unter dieser Bedingung beobachtet werden. Hier erwies sich aber die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als abbaubeschleunigend. Je höher die Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  am Anfang war, desto schneller erfolgte der Abbau.

Bei Sulfamethoxazol konnte ein Zwischenprodukt identifiziert werden, siehe Kap. 4.5.2. Es handelte sich hierbei um ein Isomer durch eine Umlagerungsreaktion des Isoxazolrings. Offensichtlich wurde die Umlagerungsreaktion in Abwesenheit von Sauerstoff bevorzugt.

Im nachfolgenden werden die berechneten Quanteneffizienzen analysiert. Die Quanteneffizienzen wurde bei pH 3-4, 6-7 und 8-9 bestimmt, siehe Tabelle 4.25.

**Tab. 4.25** Quanteneffizienten der Sulfonamide Sulfadiazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxazol und Sulfathiazol bei pH 3-4, pH 6-7 und pH 8-9.

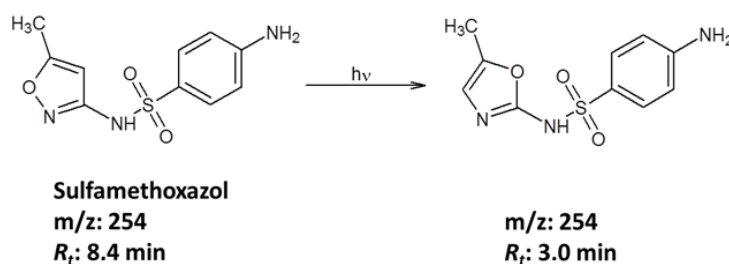
Substanz	pH	$k_1 / \text{min}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{min}$	$\epsilon_{254\text{nm}} / \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\Phi_{254\text{nm}}$
<b>Sulfadiazin</b>	3-4	0.15	4.62	15300	2.7E-03
	6-7	0.18	3.85	20272	2.5E-03
	8-9	0.13	5.33	23592	1.5E-03
<b>Sulfamethazin</b>	3-4	0.16	4.33	18086	2.5E-03
	6-7	0.07	9.90	18019	1.1E-03
	8-9	0.15	4.62	21590	1.9E-03
<b>Sulfamethoxazol</b>	3-4	0.90	0.77	9319	2.7E-02
	6-7	0.35	1.98	14204	6.9E-03
	8-9	0.35	1.98	13923	7.0E-03
<b>Sulfathiazol</b>	3-4	0.30	2.31	15542	5.4E-03
	6-7	0.30	2.31	18030	4.7E-03
	8-9	0.65	1.07	16639	1.1E-02

Die Quanteneffizienzen von Sulfamethoxazol und Sulfathiazol ergeben höhere Werte als die von Sulfadiazin und Sulfamethazin. Dies zeigt, dass die zur Reaktion führende Absorption von UVC-Strahlung bei diesen beiden Substanzen höher war, als bei Sulfadiazin und Sulfamethazin.

Nur der Abbau von Sulfamethoxazol erfolgte innerhalb von 10 min bei allen drei pH-Bereichen. Die anderen Sulfonamide benötigten eine längere Bestrahlungszeit zur vollständigen Degradation. Im Vergleich zu den bereits beschriebenen Makroliden zeigt sich dies eben in der Quanteneffizienz, die bei den Makroliden ein bis zwei Zehnerpotenzen höher lag, vgl. Tabelle 4.17.

#### 4.5.2 Besonderheit bei der Photoproduktentstehung von Sulfamethoxazol

Bei der Bestrahlung von Sulfamethoxazol wurde ein Produkt mit dem gleichen  $m/z$ -Verhältnis und einem Fragmentierungsmuster gleich dem von Sulfamethoxazol beobachtet. Bei dem Produkt handelt es sich um ein Oxazol entstanden aus der Umlagerung des Isoxazolrings, siehe Abb. 4.23<sup>195–197</sup>.



**Abb. 4.23** Primäres Phototransformationsprodukt (rechts) von Sulfamethoxazol (links) und korrespondierende  $[M+H]^+$ -Werte und Retentionszeiten

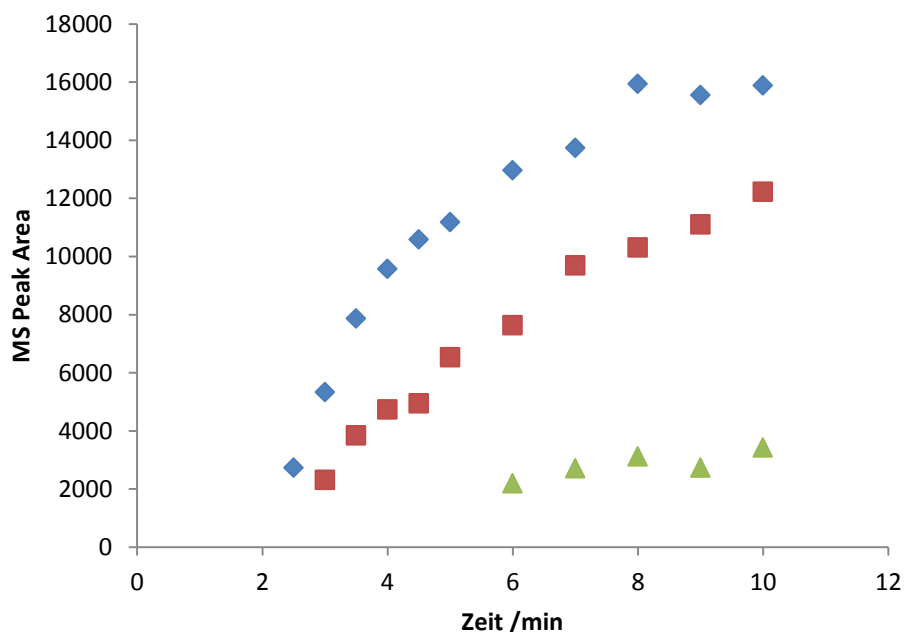
Entstehung und Abbau des Photodegradationsproduktes wurden untersucht. Dazu wurde Sulfamethoxazol sowohl mit UVA-Licht als auch UVC-Licht bestrahlt. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten und zugehörige Halbwertszeiten sind in Tabelle 4.26 widergegeben.

**Tab. 4.26** Geschwindigkeitskonstanten und zugehörige Halbwertszeiten des Photoproduktes mit m/z 254 von Sulfamethoxazol unter UVA- und UVC-Bestrahlung bei drei verschiedenen pH-Werten

Substanz	pH	Strahlu ng	$k_1$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k_2$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min
<b>Sulfamethoxazol</b>	pH 3-4	UVA	0.2	3.47	-	-
		UVC	0.9	0.77	-	-
<b>Transformationsprodukt 254</b>		UVA		Entstehung		
		UVC	0.95	0.73	2.48	0.28
<b>Sulfamethoxazol</b>	pH 6-7	UVA	0.09	7.70	-	-
		UVC	0.35	1.98	-	-
<b>Transformationsprodukt 254</b>		UVA		Entstehung		
		UVC	0.35	1.98	0.75	0.92
<b>Sulfamethoxazol</b>	pH 8-9	UVA		Entstehung		
		UVC	0.35	1.98	-	-
<b>Transformationsprodukt 254</b>		UVA	minimale Produktentstehung erkennbar			
		UVC	0.35	1.98	0.92	0.75

Vergleicht man die Transformation unter UVA- und UVC-Bestrahlung, so ist ersichtlich, dass die Umwandlung von Sulfamethoxazol deutlich langsamer unter UVA-Bestrahlung erfolgt. Auch eine Tendenz bzgl. des pH Wertes ist ersichtlich: Je höher der pH-Wert desto langsamer die Isomerisierung. Dies gilt für die Bestrahlung in beiden UV-Bereichen. Für die Degradation des Umlagerungsproduktes gilt ähnliches. Da bei UVA-Bestrahlung nur die Entstehung des Isomeren beobachtet wurde, der Abbau vermutlich bei einer längeren Bestrahlungszeit erfolgt, wurden die erhaltenen Messwerte ohne

numerische Modellierung der Messwerte in einem MS-Signal-Intensitäts-Zeit-Diagramm aufgetragen, siehe Abb. 4.24.



**Abb. 4.24** MS-Peak Area des Oxazolisomers 254 bei pH 3-4 (blau), 6-7 (rot) und 8-9 (grün)

Das Oxazolisomer entsteht bei pH 3-4 deutlich eher als bei pH 8-9. Dies stimmt mit der Beobachtung der Abnahme von Sulfamethoxazol überein.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Produktentstehung untersucht wurde, ist der Einfluss der An- und Abwesenheit von Sauerstoff. Dies wird im Folgenden für UVC-Bestrahlung diskutiert. Außerdem wird dabei der Einfluss der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe diskutiert.

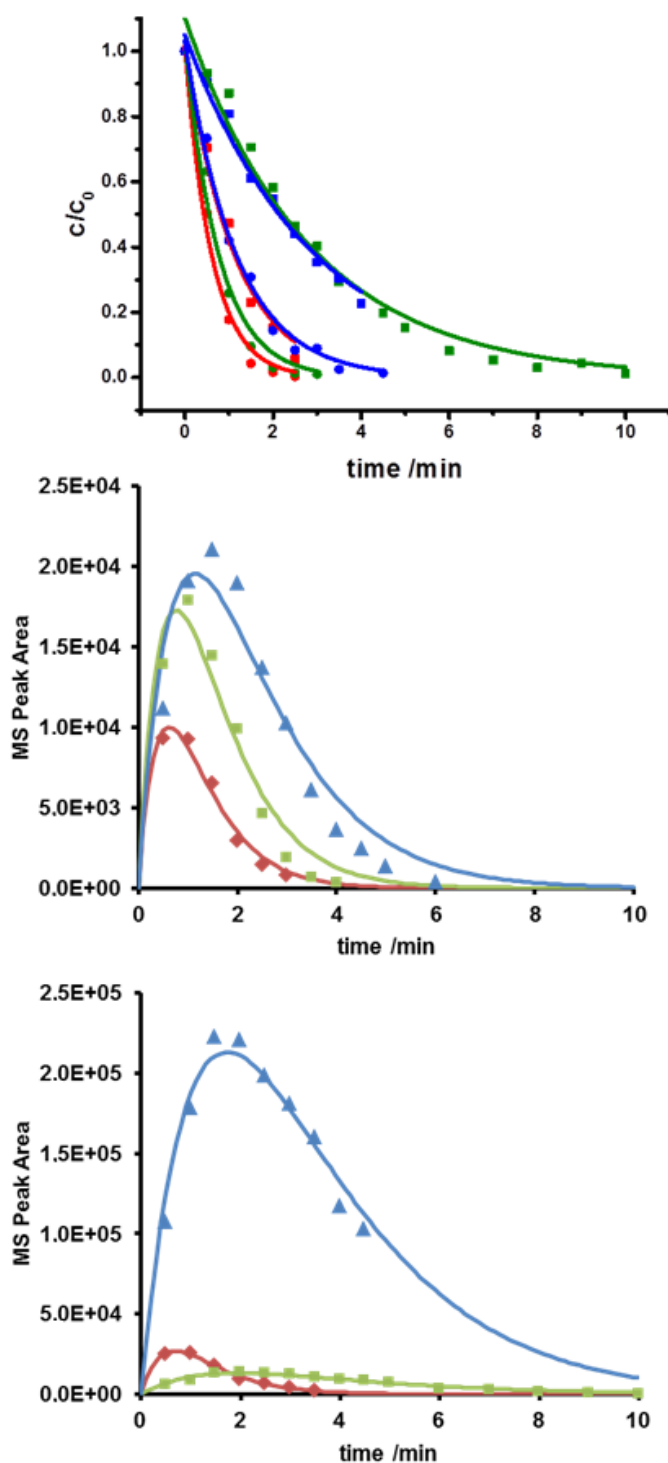
Entstehung und anschließende Abnahme des Zwischenproduktes wurde unter allen untersuchten Bedingungen durch eine Folge-Reaktion, Gleichung 2.22 beschrieben. Bei pH 3-4 in Anwesenheit von 30 mg/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe wurden nur vier Messwerte erhalten, so dass hier auf einen Fit der Mass-Area-Kurve verzichtet wurde. Die Degradation verlief zu schnell für die Zeitauflösung der verwendeten Untersuchungsmethode. Die Konstanten und zugehörige Halbwertszeiten sind in Tab. 4.27 zusammengestellt.

**Tab. 4.27** Geschwindigkeitskonstanten und zugehörige Halbwertszeiten des Oxazol-Zwischenproduktes bei UV-Bestrahlung bei verschiedenen pH-Werten, und Sauerstoff- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen

Experimentelle Bedingung			$k_1 / \text{min}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{min}$	$k_2 / \text{min}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{min}$
pH	O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>				
<b>3-4</b>	Ja	-	0.95	0.73	2.48	0.28
	Ja	10	1.26	0.55	1.96	0.35
	Ja	30	Nicht bestimmt			
	Nein	-	1.62	0.43	1.60	0.43
<b>6-7</b>	Ja	-	0.35	1.98	0.75	0.92
	Ja	10	0.48	1.44	0.73	0.95
	Ja	30	0.48	1.44	0.95	0.73
	Nein	-	1.30	0.53	1.32	0.53
<b>8-9</b>	Ja	-	0.35	1.98	0.92	0.75
	Ja	10	0.47	1.47	0.92	0.75
	Ja	30	0.57	1.22	1.02	0.68
	Nein	-	0.86	0.81	0.89	0.78

Der schnellste Aufbau des Oxazol-Zwischenproduktes wurde bei Sauerstoffabwesenheit beobachtet. Dies wurde bei der Degradation von Sulfamethoxazol ebenfalls gefunden. Die Abnahme von Sulfamethoxazol und der Verlauf der Entstehung und Abnahme des Primären Produktes, des Oxazolisomeren, sind für ausgewählte Bedingungen exemplarisch in Abb. 4.25 gezeigt.





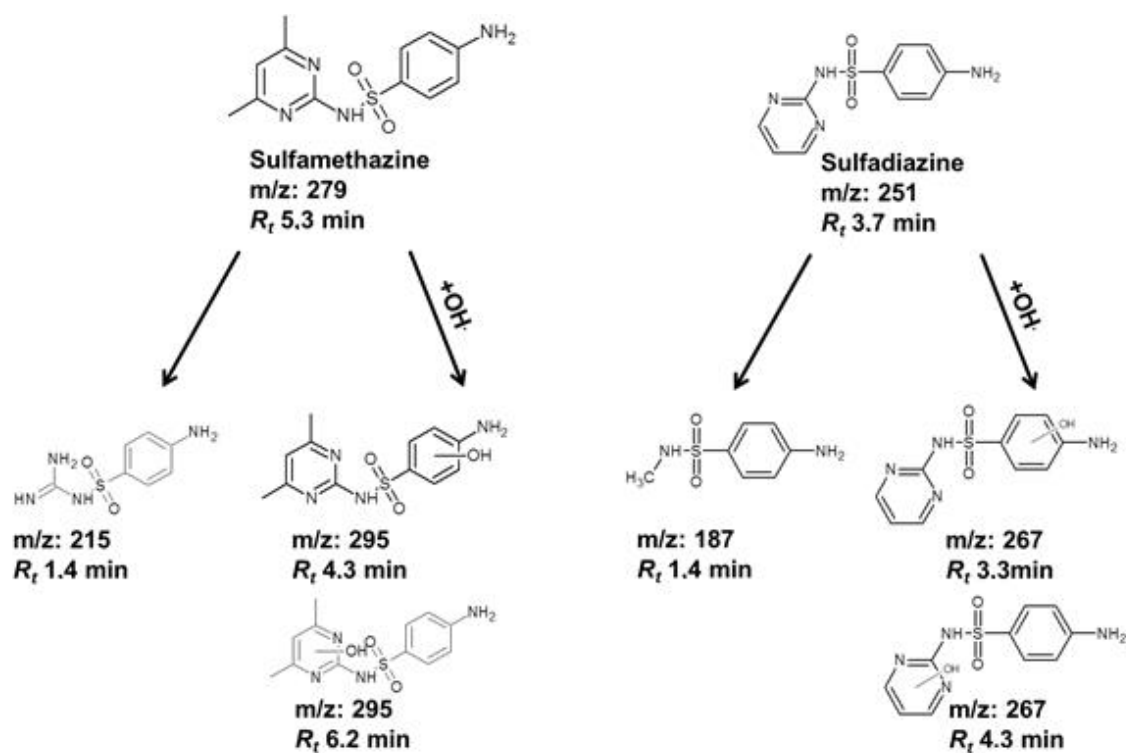
**Abb. 4.25** Abnahme von Sulfamethoxazol unter Anwesenheit (■) und Abwesenheit (●) von Sauerstoff. Vergleich der Entstehung des Photodegradationsproduktes unter Sauerstoffeinfluss (oben) und bei Sauerstoffabwesenheit (unten) bei pH 3-4 (rot), pH 6-7 (grün) und pH 8-9 (blau)

In Abb. 4.25 ist deutlich zu erkennen, dass bei pH 8-9 in Abwesenheit von Sauerstoff die größte Menge an Phototransformationsprodukt entstand. Unter diesen Bedingungen verlief die Eliminierung auch am längsten. Folgende Unterschiede zeigten sich bei Sauerstoffan- und -abwesenheit. Bei Sauerstoffanwesenheit bei pH 6-7 entstand mehr Produkt, als bei Sauerstoffabwesenheit bei pH 3-4. Bei Sauerstoffanwesenheit lässt sich erkennen, dass je höher der pH-Wert desto mehr Produkt auftrat, desto länger aber auch der Abbau des Produktes dauerte. Bei Sauerstoffabwesenheit konnte das Produkt bereits nach ca. 7 min bei pH 3-4 und 6-7 vollständig aus der Lösung eliminiert werden, bei pH 8-9 nicht.

Bei Anwesenheit von Sauerstoff konnte die Produktentstehung und der dann folgende Abbau durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beschleunigt werden. Hierbei erwies sich die Wahl einer höheren Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  vorteilhaft. So konnte der Abbau des Degradationsproduktes innerhalb von 10 min erfolgen. Damit kann eine mögliche Gefahr für die Umwelt, die von dieser Substanz ausgehen kann, reduziert werden, wenn diese Form von AOP angewendet wird.

#### **4.5.3 Photodegradationsprodukte von Sulfamethazin und Sulfadiazin**

Bei der Photodegradation von Sulfamethazin und Sulfadiazin unter UVC-Bestrahlung konnten in Abb. 4.26 abgebildete Photodegradationsprodukte identifiziert werden.



**Abb. 4.26** Photodegradationsprodukte von Sulfamethazin und Sulfadiazin und deren Entstehungswege

Wie zu erkennen ist, verläuft die Produktbildung von Sulfamethazin und Sulfadiazin aufgrund ähnlicher Strukturen analog. Beide Ausgangssubstanzen besitzen je einen para-substituierten Benzolring und einen Pyrimidinring. Hydroxylradikal-Substituenten wurden an beiden Ringen nachgewiesen. Dies bestätigen die unterschiedlichen entstandenen Fragmentierungsmuster in MS/MS-Experimenten. Auch Degradationsprodukte ohne Hydroxylbeteiligung wurden nachgewiesen, wie in Abb. 4.26 und Tab 4.28 ersichtlich.

Tab. 4.28 Fragmentierungsmuster von Sulfadiazin und Sulfamethazin

[M+H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup>	Struktur
251 Sulfadiazin	156 	
187	155 	
267	172 	
267	156 	
279 Sulfamethazin	186 	
215		
295	124 	
295	202 	

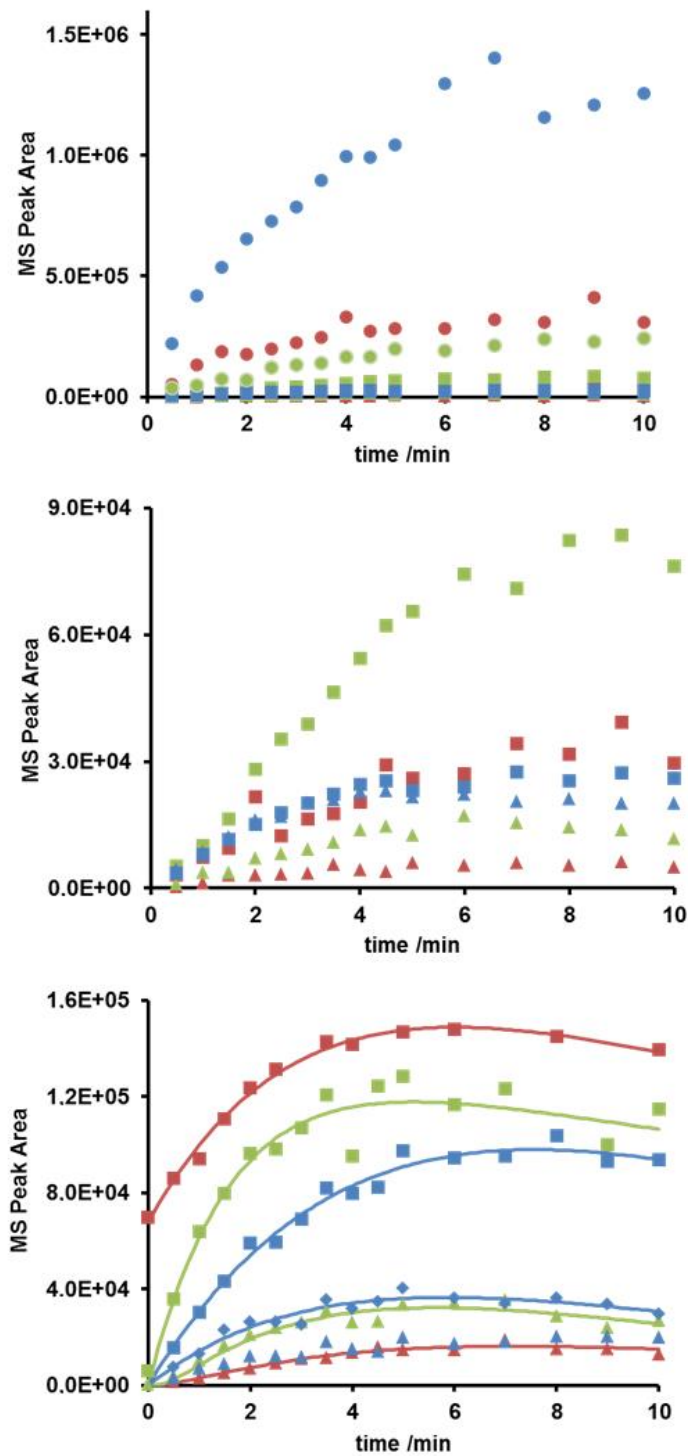
Hierbei wurde jeweils der Pyrimidinring fragmentiert oder eliminiert. Interessant sind nun die korrespondierende Geschwindigkeitskonstanten, die nachfolgend am Beispiel von pH 3-4, pH 6-7 und pH 8-9 für beide Substanzen diskutiert werden.

Babic *et al.* und Batista *et al.* haben in ihren Studien an Sulfamethazin ähnliche Photodegradationsprodukte gefunden, jedoch nur ein Produkt, das eine OH-Gruppe an einem der 6-Ringe aufwies<sup>198,199</sup>. Studien, in denen Substitution an beiden Ringen beobachtet wurde, stammen von Fukahori *et al.* und Guo *et al.*<sup>200,201</sup>. Bei Sulfadiazin konnten Li *et al.* zwei Produkte mit  $m/z = 187$  und  $267$  identifizieren. Allerdings wurde auch hier nur ein Produkt beschrieben, in dem es zur Substitution an einem Ring kam<sup>202</sup>. Sukul *et al.* fanden zwei Photodegradationsprodukte mit  $m/z = 267$  und erhielten dabei das gleiche Fragmentierungsmuster für beide Substanzen. Sie interpretierten dies als

Substitution an nur einem 6-Ring aber an unterschiedlichen Positionen<sup>203</sup>. Somit konnte in dieser Arbeit ein neues Photodegradationsprodukt identifiziert werden. Durch MS/MS-Experimente ließen sich strukturelle Beweise für die Hydroxylierung beider Ringe finden. Das zweite Produkt entstand nur bei pH 8-9 unter allen verschiedenen Bedingungen.

Warum konnten bei Sulfadiazin und Sulfamethazin Hydroxylzwischenprodukte identifiziert werden, bei Sufamethoxazol und Sulfathiazol nicht? Eine Erklärung hierfür liefert die Quanteneffizienz, siehe Tab. 4.23. Sulfamethoxazol und Sulfathiazol absorbierten die UVC-Strahlen effektiver als Sufadiazin und Sulfamethazin, so dass eine direkte photoinduzierte Zerstörung dieser beiden Sulfonamide bevorzugt auftrat.

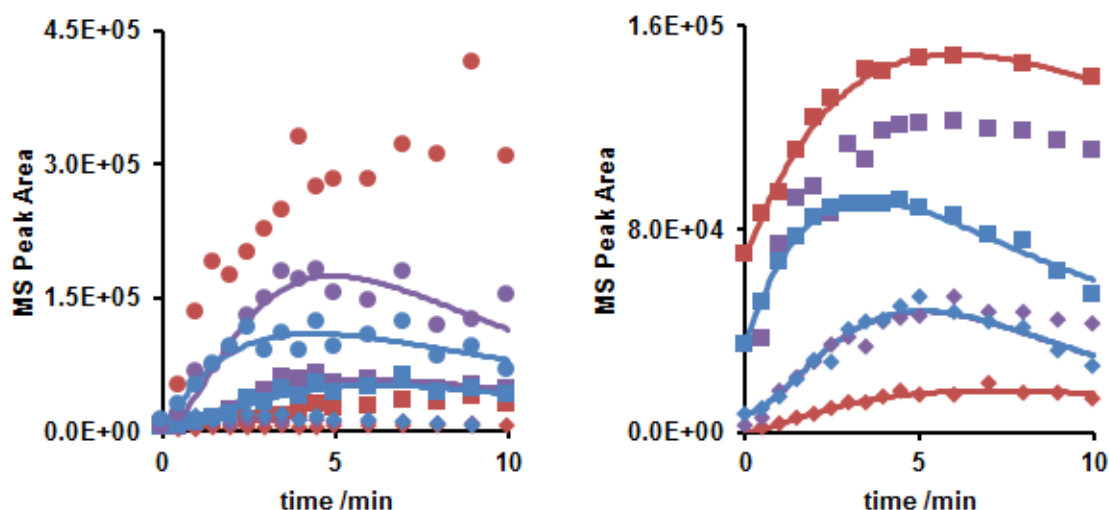
Die kinetische Beschreibung der Abbauprodukte bei unterschiedlichen pH-Werten ist in Abb. 4.27 dargestellt. Die meisten Zwischenprodukte von Sulfamethazin konnten nicht modelliert werden, da die Bildung der Substanz aufgenommen, jedoch nur ein geringer Teil des Abbaus beobachtet wurde. Alle Mass-Area-Zeit Kurven der Zwischenprodukte von Sulfamethazin und Sulfadiazin sind in Abb. 4.27 dargestellt. Der Großteil der Daten konnte als Folge-Reaktion nach Gl. 2.22 beschrieben werden.



**Abb. 4.27** Konzentrations-Zeit Kurven der Photodegradationsprodukte von Sulfamethazin mit m/z von 215 (●), 295a (■) und 295b (▲); gesamte Kurven oben links, Auswahl der Kurven oben rechts; Unten links: Konzentrations-Zeit Kurven der Photodegradationsprodukte von Sulfadiazin mit m/z von: 187 (■), 267a (▲) und 267b (♦). Aufgenommen bei pH 3-4 (rot), pH 6-7 (grün) und pH 8-9 (blau).

Die Zwischenprodukte von Sulfamethazin mit  $m/z$  von 215 und von Sulfadiazin mit  $m/z$  von 187 wurden am häufigsten gebildet. Dies könnte ein Effekt der Ionisierungseffizienz im ESI-MS sein, die bei den Substanzen unterschiedlich sein kann.

Der Einfluss von  $H_2O_2$  ist in der nun nachfolgenden Abb. 4.28 bei pH 3-4 dargestellt.



**Abb. 4.28** Konzentrations-Zeit Kurven von den Photogradationsprodukten von Sulfamethazin (links), von 187 (■), 267a (♦) und 267b (●) und von Sulfadiazin (rechts), von 215 (●), 295a (■) und 295b (♦) bei pH 3-4 bei 0 mg/L  $H_2O_2$  (rot), 10 mg/L  $H_2O_2$  (lila) und 30 mg/L (blau).

Je höher die Konzentration an  $H_2O_2$ , desto schneller der Abbauprozess der Zwischenprodukte. Die Produkte mit  $m/z = 215$  von Sulfamethazin und  $m/z = 187$  von Sulfadiazin wurden ebenfalls schneller gebildet und abgebaut bei erhöhter  $H_2O_2$ -Konzentration. Eine Bestrahlung von 10 min reichte aber nicht aus, um die entstandenen Zwischenprodukte vollständig aus dem jeweiligen System zu eliminieren.

#### 4.5.4 Ökotoxizitätseinschätzung

Zunächst wurden die MHK-Werte der Sulfonamide bestimmt, siehe Tabelle 4.27. Beide in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismenstämme wurden gehemmt. Bis auf Sulfamethoxazol bei *Bacillus subtilis* lagen die MHKs deutlich über der eingesetzten Konzentration der Photodegradationsversuche, so dass von einer Wirksamkeit der

Sulfonamide gegen die beiden untersuchten Bakterienstämme nicht ausgegangen werden kann. Diese Behauptung stimmte mit der Literatur überein<sup>204</sup>.

Zur Beurteilung der Ökotoxizität der einzelnen Substanzen wurde wiederum eine QSAR Analyse durchgeführt, siehe Tabelle 4.29.

**Tab. 4.29 Bestimmung der Toxizität von Sulfonamiden und deren Photodegradationsprodukte mittels QSAR**

Substanz	Photoinduzierte Toxizität an <i>Daphnia magna</i> <sup>a</sup>	LC <sub>50</sub> (48h) Branchiopoda <sup>a,b</sup> /mg L <sup>-1</sup>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <sup>c</sup> /mg L <sup>-1</sup>	<i>Bacillus subtilis</i> <sup>c</sup> /mg L <sup>-1</sup>
<b>Sulfadiazin</b>	nicht phototoxisch	1.14E+04	102.5	104.50
<b>SDZ 187</b>	nicht phototoxisch	4.91E+03	-	-
<b>SDZ 267 a</b>	nicht phototoxisch	3.34E+04	-	-
<b>SDZ 267 b</b>	nicht phototoxisch	3.34E+04	-	-
<b>Sulfamethazin</b>	nicht phototoxisch	1.25E+03	-	99.01
<b>SMZ 215</b>	nicht phototoxisch	4.55E+04	-	-
<b>SMZ 295 a</b>	nicht phototoxisch	3.63E+03	-	-
<b>SMZ 295 b</b>	nicht phototoxisch	3.63E+03	-	-
<b>Sulfamethoxazol</b>	nicht phototoxisch	2.05E+03	48.51	6.4
<b>SMX254</b>	nicht phototoxisch	2.05E+03	-	-
<b>Sulfathiazol</b>	nicht phototoxisch	1.25E+03	25.43	24.26

<sup>a</sup> vorhergesagt mit QSAR Toolbox

<sup>b</sup> undef. Testorganismus

<sup>c</sup> best. MHK

Untersucht wurde die Vorhersage der Phototoxizität an *Daphnia magna* und die Sterblichkeit von Kiemenfußkrebse. Beide Organismen wurden ausgewählt, da sie in Gewässern bzw. für die Beurteilung der Wasserqualität eingesetzt werden.

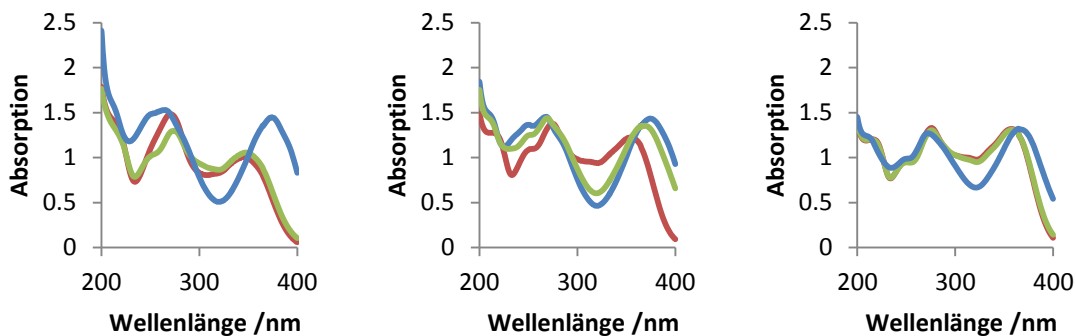
Mittels QSAR Toolbox und T.E.S.T wurde die QSAR-Analyse vorgenommen, wobei die Software T.E.S.T keine Resultate lieferte. Somit wurde die Analyse mittels der QSAR Toolbox vorgenommen. Die Sterblichkeit der Kiemenfußkrebse lag über 1 g/L für alle vorgeschlagenen Strukturen der Photodegradationsprodukte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine Phototoxizität von den Substanzen ausgeht. Auch die Kalkulierung der Phototoxizität an *Daphnia magna* zeigte, dass die Substanzen nicht



phototoxisch waren. Diese Prognosen sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten. De Liguoro *et al.* untersuchten Sulfonamide bezüglich der Toxizität gegenüber *Daphnia magna* und zeigten, dass diese Pharmazeutika negative Wirkung haben können<sup>205</sup>. Jung *et al.* berichteten über die Beobachtung von Phototoxizität bei einigen Sulfonamiden<sup>206</sup>.

## 4.6 Tetracycline

In diesem Kapitel wird die Untersuchung dreier Tetracycline beschrieben: Doxycyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin. Auch hier wurden zunächst einmal UV/Vis-Spektren in wässriger Lösung bei drei verschiedenen pH-Werten aufgenommen, siehe Abb. 4.29.



**Abb. 4.29** UV/Vis-Spektren von 50 mg/L Doxycyclin (links), 50 mg/L Oxytetracyclin (mitte) und 25 mg/L Tetracyclin (rechts) bei pH 3-4 (rot), pH 6-7 (grün) und pH 8-9 (blau).

Bei den UV/Vis-Spektren der Tetracycline lassen sich zwei Absorptionsbanden erkennen: im UVC-Bereich zwischen 255 und 275 nm und im UVA-Bereich zwischen 350 nm und 370 nm. Daher steht bei den Tetracyclinen besonders die Verwendung verschiedener Lichtquellen mit unterschiedlichen Strahlungscharakteristiken im Fokus der Untersuchung. Photodegradationsprodukte der drei Tetracycline wurden weder unter UVA noch unter UVC-Bestrahlung nachgewiesen, so dass hier ausschließlich auf die Kinetik des photoinduzierten Abbaus eingegangen wird.

#### 4.6.1 Degradation von Tetracyclinen durch UVC-Bestrahlung

Alle Degradationsverläufe konnten nach einer Kinetik erster Ordnung erklärt und die Daten simuliert werden. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten und die dazugehörigen Halbwertszeiten sind in Tab. 4.30 dargestellt.

**Tab. 4.30** Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten von den Photodegradationsexperimenten von Oxytetracyclin, Doxycyclin und Tetracyclin bei verschiedenen pH Werten und Sauerstoffan- und -abwesenheit

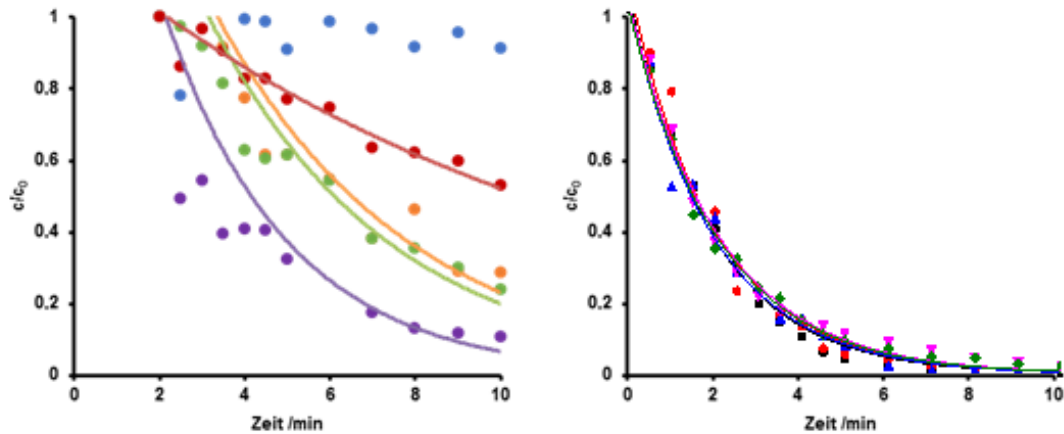
Experimentelle Bed.			Oxytetracyclin		Doxycyclin		Tetracyclin	
pH	O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mg · L <sup>-1</sup>	<i>k</i> /min <sup>-1</sup>	<i>t</i> <sub>1/2</sub> /min	<i>k</i> /min <sup>-1</sup>	<i>t</i> <sub>1/2</sub> /min	<i>k</i> /min <sup>-1</sup>	<i>t</i> <sub>1/2</sub> /min
3-4	Nein	-	0.32	2.15	0.32	2.13	0.35	1.97
	Ja	-	0.35	1.99	0.38	1.84	0.40	1.74
	Ja	10	0.27	2.54	0.44	1.59	0.64	1.08
	Ja	30	0.55	1.26	0.76	0.92	0.85	0.82
6-7	Nein	-	0.41	1.69	0.27	2.60	0.37	1.86
	Ja	-	0.52	1.34	0.39	1.77	0.52	1.34
	Ja	10	0.53	1.31	0.64	1.09	0.91	0.76
	Ja	30	1.02	0.68	0.70	0.99	0.69	1.01
8-9	Nein	-	0.48	1.46	0.30	2.30	0.31	2.23
	Ja	-	0.56	1.23	0.66	1.05	0.61	1.13
	Ja	10	0.67	1.03	0.66	1.05	1.03	0.67
	Ja	30	0.90	0.77	0.84	0.83	1.08	0.64

Die Abwesenheit von Sauerstoff in der Lösung erwies sich nachteilig für einen schnellen Abbau der Tetracycline. Dafür konnte durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> der Abbau deutlich beschleunigt werden. Eine höhere Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> korreliert mit einem schnelleren Abbau. Auch die Variation des pH-Wertes beeinflusste den Abbau. Ein höherer pH-Wert verursachte einen schnelleren Abbau.

#### 4.6.2 Effektivität des photoinduzierten Abbaus in Anwesenheit von TiO<sub>2</sub>

Exemplarisch bei Tetracyclin wurde der Einsatz von TiO<sub>2</sub> und TiO<sub>2</sub>-P25 in Verbindung mit UVA und UVC-Bestrahlung untersucht. In Abb. 4.30 sind die Konzentrations-Zeit

Verläufe von Tetracyclin bei Verwendung zweier Lampen mit Emissionen in diesen Wellenlängenbereichen dargestellt.



**Abb. 4.30** Photoinduzierte Degradation von Tetracyclin bei pH 3-4 unter Verwendung von UVA-Strahlung (links) ohne TiO<sub>2</sub> (blau), mit 50 mg/L TiO<sub>2</sub> P25 (orange), 100 mg/L TiO<sub>2</sub> P25 (lila), 50 mg/L TiO<sub>2</sub> (grün), 100 mg/L TiO<sub>2</sub> (rot), und unter Verwendung von UVC-Strahlung (rechts)

Die verwendete UVA-Lampe erreichte erst nach 2 min Vorwärmzeit volle Leistung. Deswegen wurde die nach 2 min bestimmte Konzentration als Anfangskonzentration gesetzt. Die Datenpunkte wurden um diese Verzögerung korrigiert.

Bei UVA-Bestrahlung wurde ein zu vernachlässigender Abbau in Abwesenheit von Katalysatoren beobachtet. In Anwesenheit von TiO<sub>2</sub> konnte ein Abbau beobachtet werden. Hier zeigte sich, dass die P25-Modifikation effektiver war, der Abbau also schneller verlief. Auch eine Erhöhung der Konzentration erwies sich beschleunigend für den Abbau. Die Degradation verlief unter UVC-Bestrahlung ohne Katalysatorzugabe doppelt so schnell,  $k_{\text{UVC}} \approx 0.4 - 0.5 \text{ min}^{-1}$ , wie unter UVA-Bestrahlung mit Katalysatorzugabe,  $k_{\text{UVA}} \approx 0.1 - 0.3 \text{ min}^{-1}$ , siehe Tabelle 4.31.

**Tab. 4.31** Geschwindigkeitskonstanten, Halbwertszeiten und Quanteneffizienzen der Tetracyclindegradation ohne  $\text{TiO}_2$ -Zugabe und mit 10, 20, 50 und 100 mg/L  $\text{TiO}_2$ -Zugabe und  $\text{TiO}_2$ -P25-Zugabe

Lampe	$\text{TiO}_2$	P25	$k_1$ /min	$t_{1/2}$ /min <sup>-1</sup>	$\Phi_{254nm}$	$\Phi_{313nm}$	$\Phi_{365nm}$	$\Sigma$ ( $\Phi_{254nm} + \Phi_{313nm} + \Phi_{365nm}$ )
UVA			kein Abbau					
		50	0.21	3.31		1.38E-01	1.08E-02	1.49E-01
		100	0.32	2.17		2.10E-01	1.65E-02	2.27E-01
			0.23	3.02		1.51E-01	1.18E-02	1.63E-01
	100		0.10	6.93		6.59E-02	5.17E-03	7.11E-02
UVC	-							
		-	0.40	1.74	1.20E-02	7.64E-02	4.08E-02	1.29E-01
		10	0.50	1.38	1.15E-02	9.43E-02	4.97E-02	1.56E-01
		20	0.50	1.38	1.15E-02	9.42E-02	4.97E-02	1.55E-01
		100	0.48	1.46	1.09E-02	8.94E-02	4.71E-02	1.47E-01
		500	0.48	1.44	1.10E-02	9.04E-02	4.76E-02	1.49E-01

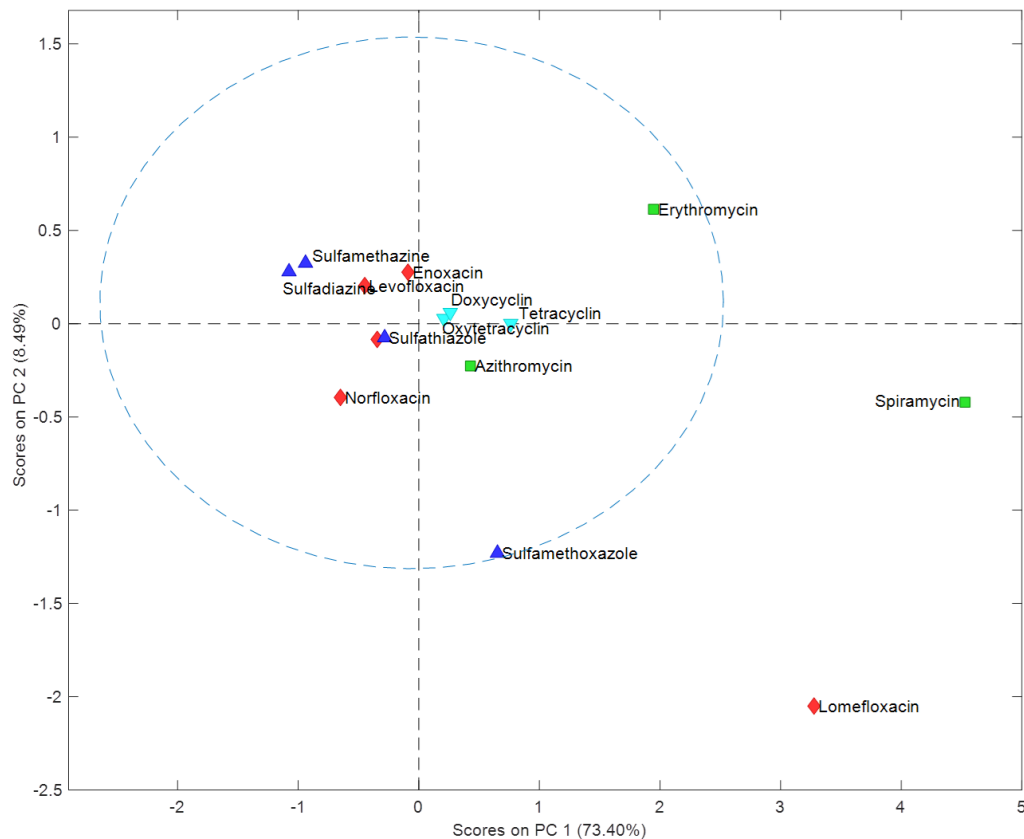
Die Quanteneffizienz bei 254 nm konnte nur bei UVC-Bestrahlung bestimmt werden. Die Werte, die bei unterschiedlichen Katalysatormengen erreicht wurden, sind ähnlich und betrugen  $1.14\text{E-}02 \pm 0.06\text{E-}02$ . Dies war zu erwarten, da der Abbau unabhängig von der zugegebenen  $\text{TiO}_2$ -Menge nahezu gleich verlief. Auch wurden bei einer gegebenen Wellenlänge ähnliche Werte erhalten, vgl. Tabelle 4.31, da sich die eingestrahlte Lampenleistung bei verschiedenen Wellenlängen nicht veränderte. Die Summe der Quanteneffizienzen von zwei bzw. drei Wellenlängen, d.h. 254 nm, 313 nm und 364 nm, zeigte für UVA- und UVC-Bestrahlung ebenfalls ähnliche Werte und lag bei  $1.50\text{E-}01 \pm 7.8\text{E-}02$ . Die individuellen Quanteneffizienzen bei 313 nm und 364 nm zeigten bei Verwendung unterschiedlicher Strahlung Unterschiede. Bei UVC-Bestrahlung war die Quanteneffizienz bei 313 nm um eine Zehnerpotenz niedriger als bei UVA-Bestrahlung. Dafür lag die Quanteneffizienz bei 365 nm bei UVA-Bestrahlung um ca.  $3.0\text{E-}02$  niedriger als bei UVC-Bestrahlung.

Die Gesamtquanteneffizienz im UV-Bereich zeigte, dass im Schnitt ca. 15 % der eingestrahnten Lampenleistung zu einer Reaktion führten. Dies gilt sowohl für UVA- als auch für UVC-Bestrahlung. Jedoch wurden durch UVC-Bestrahlung doppelt so hohe Geschwindigkeitskonstanten erhalten. Dies resultierte daraus, dass im Falle der UVC-Bestrahlung die OH-Radikal-Bildung bei 185 nm nicht aktinometrisch erfasst werden konnte und somit nicht in die Berechnung der Quanteneffizienzen einfluss. So konnte nicht bestimmt werden, wie stark die OH-Bildung durch UVC-Bestrahlung war, die essentiellen Einfluss auf die photoinduzierte Degradation hat.

#### **4.7 Vergleich der Vertreter der 4 untersuchten Antibiotikaklassen**

In Kapitel 4.3.2 wurde bereits bei den Fluorchinolonen die PCA erfolgreich zur Visualisierung der Einflussfaktoren auf die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten angewendet. Es wurde eine PCA, basierend auf den Geschwindigkeitskonstanten aller untersuchten Antibiotika, mit Ausnahme von Tylosin, bei pH 3-4, pH 6-7 und pH 8-9, und ohne Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mit 10 und 30 mg/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit und ohne Sauerstoff durch UVC-Bestrahlung durchgeführt. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob es Unterschiede zwischen den Antibiotikaklassen gibt oder ob einzelne Substanzen sich

anders bezüglich des photoinduzierten Degradationsprozesses verhalten. Abb. 4.31 zeigt die PCA.

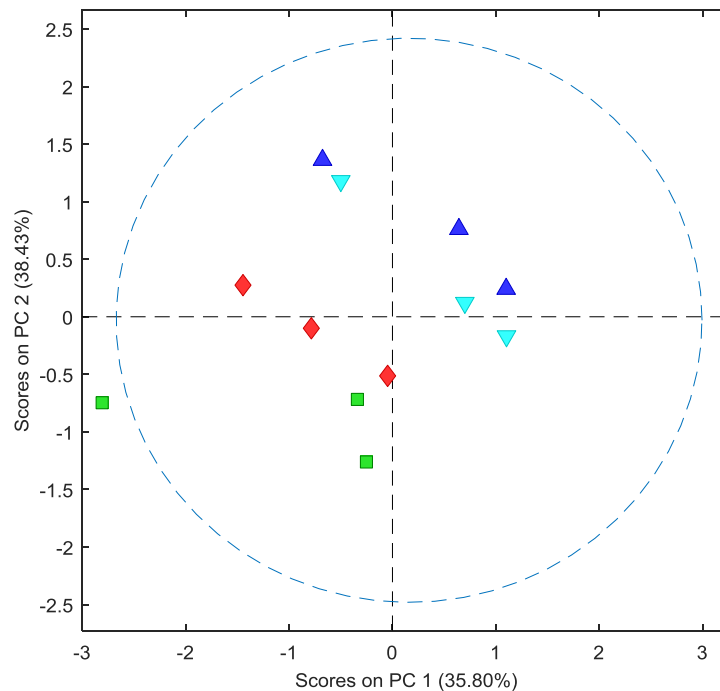


**Abb. 4.31** Score-Plot der PCA, Farbcodierung nach den Antibiotikaklassen Fluorchinolone (rot), Makrolide (grün), Sulfonamide (dunkelblau) und Tetracycline (hellblau)

Spiramycin und Lomefloxacin liegen abseits der anderen Substanzen. Auch Sulfamethoxazol und Erythromycin sind etwas weiter von den anderen Substanzen entfernt. Bei diesen vier Substanzen wurden die schnellsten Abbaugeschwindigkeiten bei UVC-Bestrahlung unter allen experimentellen Bedingungen beobachtet. Die Abbaugeschwindigkeiten der anderen Substanzen weichen weniger stark voneinander ab, so dass diese Substanzen im Score-Plot nahe bei einander liegen. Der Abbau durch UVC-Bestrahlung wurde auch durch OH-Radikale induziert. Es ist anzunehmen, dass Radikale daher immer mit den gleichen Geschwindigkeitskonstanten gebildet wurden. Der

Unterschied bei den untersuchten Antibiotika ist auf ihre Struktur zurückzuführen. Je schneller die Substanzen mit OH-Radikalen reagieren, desto schneller erfolgt ihr Abbau.

Als nächstes wurden die experimentellen Bedingungen verglichen. Dies wurde auch mittels PCA durch Invertierung der Datenmatrix durchgeführt, siehe Abb. 4.32.



**Abb. 4.32** Score-Plot der PCA bei Sauerstoffabwesenheit (dunkelblau), ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe (hellblau), mit 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rot) und 30 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (grün) unter UVC-Bestrahlung

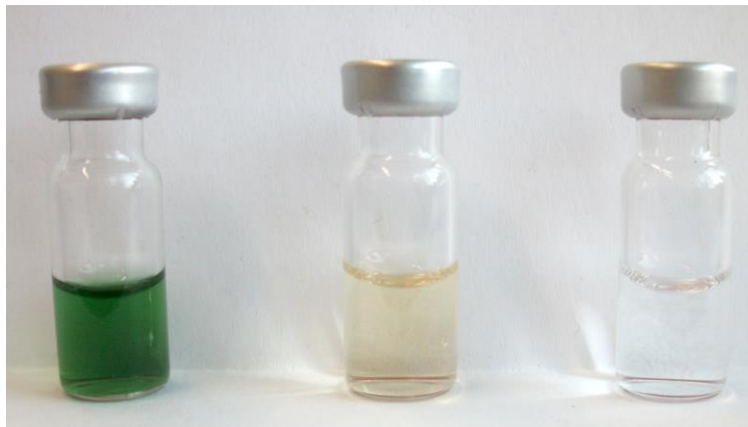
Alle Proben, die mit 30 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt wurden, verteilen sich unten links. PC1 und PC2 sind hier im negativen Bereich. Weiter im positiven Bereich entlang PC1 und PC 2 liegen die Proben mit 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gefolgt von den Proben ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe. Zum Schluss oben rechts, wo PC1 und PC 2 positiv sind, verteilen sich die Scores der sauerstofffreien Bedingungen. Entlang der PC1 und PC2 vom negativen zum positiven Bereich werden die Geschwindigkeitskonstanten kleiner, d.h. der Abbau wird langsamer. Daraus lässt sich schließen, dass der schnellste Abbau durch 30 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgt und der langsamste demnach unter sauerstofffreien Bedingungen erfolgt. Die Anwesenheit

von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und dessen beschleunigender Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit wurden bereits in dieser Arbeit ausführlich diskutiert.

An- und Abwesenheit von Sauerstoff zeigten bei den untersuchten Wirkstoffen unterschiedlichen Einfluss. Bei den Sulfonamiden zum Beispiel wirkte sich je nach Sulfonamid Sauerstoff auf den Abbau beschleunigend oder verlangsamend aus. Die durchgeführte PCA jedoch umfasste alle untersuchten Substanzen. Somit kann hieraus abgeleitet werden, dass sich die Anwesenheit von Sauerstoff für die meisten untersuchten Substanzen positiv, d. h. beschleunigend auf den photoinduzierten Abbaumechanismus auswirkt.

#### **4.8 Eliminierung von Pharmazeutika aus Wasserproben**

Exemplarisch wurden Untersuchungen zur Eliminierung von Pharmazeutika aus Wasserproben aus der Umwelt durchgeführt. Zunächst wurden Proben aus dem Rinderbach, zur geographischen Lage siehe Kap. 3.2, entnommen und 10 min UVC-Strahlung unter neutralen Bedingungen ausgesetzt, siehe Abb. 4.33.

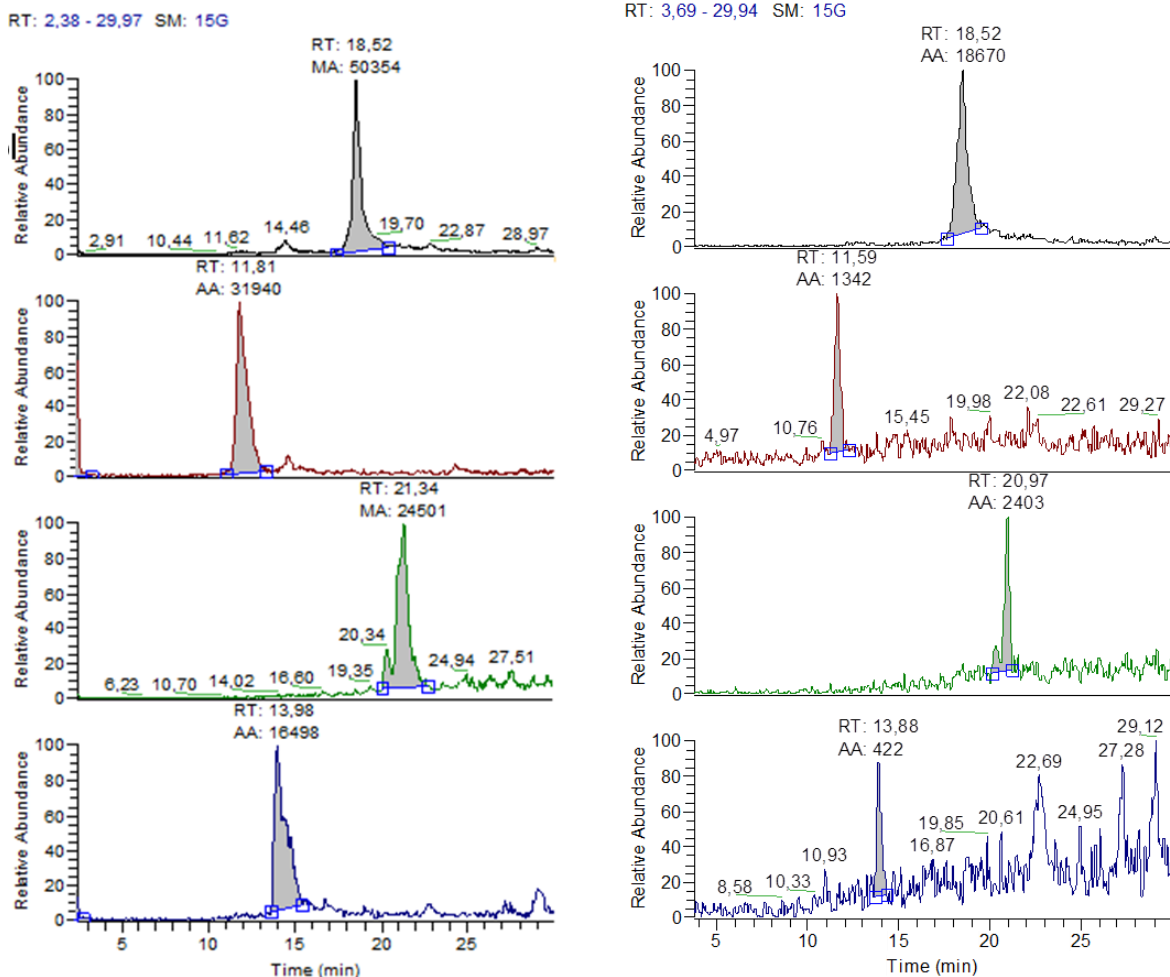


**Abb. 4.33** Proben aus dem Rinderbach nach SPE-Behandlung vor (links) und nach (mitte) der UVC-Bestrahlung im Vergleich zu VE-Wasser (rechts).

Man erkennt deutlich den Unterschied vor und nach der Bestrahlung. Vor der Bestrahlung war das Wasser grünlich, was auf Algenreste oder chlorophyllhaltige Substanzen oder Organismen in der Umwelt zurückschließen lässt. Nach der Bestrahlung



war die Lösung leicht gelblich. Somit konnte die sichtbare grünliche Verfärbung entfernt werden. Die LC-MS-Analyse soll Rückschlüsse geben, ob und welche Substanzen in den Wasserproben vorhanden waren, siehe Abb. 4.34.



**Abb. 4.34** EIC auf Basis der Sulfamethoxazol (oben), Metoprolol (mitte oben), Clarithromycin (mitte unten) und Bisoprolol (unten) zugrunde liegenden m/z- Werte der quasi-Molekülonen vor (links) und nach (rechts) 10-minütiger UVC-Bestrahlung. Die Intensitäten sind normiert, sodass nur der Flächeninhalt als quantitatives Maß für einen Vergleich herangezogen werden kann.

In der untersuchten Probe konnten vier Pharmazeutika identifiziert werden: Sulfamethoxazol, Metoprolol, Clarithromycin und Bisoprolol. Anhand der Fläche der einzelnen Peaks kann nun abgeschätzt werden, in wie weit der Abbau erfolgreich war, siehe Tab. 4.32.

**Tab. 4.32** Signalfächen der EICs nach 10-minütiger UVC-Bestrahlung einer Wasserprobe aus dem Rinderbach

	vor UVC-Bestrahlung	nach UVC-Bestrahlung	prozentualer Abbau
<b>Sulfamethoxazol</b>	50354	18670	62.92
<b>Metoprolol</b>	31940	1342	95.80
<b>Clarithromycin</b>	24501	2403	90.19
<b>Bisoprolol</b>	16498	422	97.44

Metoprolol, Clarithromycin und Bisoprolol konnten nach 10-minütiger UVC-Bestrahlung zu über 90% abgebaut werden. Die Untersuchungen an Antibiotika in dieser Arbeit haben gezeigt, dass längere Bestrahlungszeit oder die Zugabe von  $\text{TiO}_2$  oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder die Verwendung einer im UVA-Bereich emittierenden Lampe effektiver sein könnten. Daher wurden weitere Bedingungen ausprobiert, wobei Proben aus dem Ablauf des Klärwerkes Krefeld entnommen wurden und der pH-Wert, die Strahlungsart, die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{TiO}_2$  bestehend aus einer Mischung aus Brookit, Rutil und Anatas variiert wurden. Dies wird am Beispiel von Metoprolol dargestellt, da Metoprolol in allen Proben des Rinderbachs, vgl. Tab. 4.1, nachgewiesen werden konnte, siehe Tab 4.33.

**Tab. 4.33** Ausgewählte photoinduzierte Abbauprobversuche mit einer Probe aus dem Klärwerk Krefeld als Matrix am Beispiel von aufgestocktem Metoprolol

Lampe	pH	$\text{TiO}_2$ /mg/L	$\text{H}_2\text{O}_2$ /mg/L	Prozentualer Abbau
<b>UVA</b>	3-4			28
	6-7			41
	8-9			43
	6-7	50		60
	6-7	100		35
<b>UVC</b>	3-4			46
	6-7			78
	8-9			93
	6-7		10	91
	6-7		30	100

Am effektivsten erwies sich für den Metoprololabbau die UVC-Bestrahlung. Durch Variation des pH-Wertes konnte die Geschwindigkeit ebenfalls beeinflusst werden. Mit höherem pH-Wert nahm die Abbaugeschwindigkeit zu. Dies galt sowohl für die Bestrahlung mit UVA-Licht als auch für die Bestrahlung mit UVC-Licht. Die Zugabe

von  $\text{TiO}_2$  hatte nur einen geringen positiven Effekt. Hier kam es zu einem gegenteiligen Effekt: Je mehr  $\text{TiO}_2$  hinzugegeben wurde, desto langsamer verlief der Abbau. Allerdings wurde bei dieser Versuchsreihe nicht die P25-Modifikation sondern das gewöhnliche  $\text{TiO}_2$  verwendet. Daher überwog die Lichtstreuung und damit Verminderung des Lichts, das absorbiert werden konnte und somit zum Abbau von Metoprolol führen konnte.

## **Zusammenfassung und Ausblick**

In dieser Arbeit wurden 16 Antibiotika aus vier Antibiotikaklassen mittels photoinduziertem Abbau unter Verwendung von AOPs untersucht, um die Effektivität einer potentiellen vierten Reinigungsstufe in Klärwerken abzuschätzen. Dazu wurde eine umfangreiche Literaturstudie durchgeführt, die die Anwesenheit und die Problematik der Antibiotikaklassen darstellen und die Auswahl der Antibiotika bestätigt. Die Analysen wurden mittels HPLC-ESI-IT-MS und HPLC-ESI-Q-TOF-MS durchgeführt. Im Fokus stand hier die UVC-Bestrahlung, deren Effektivität noch durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gesteigert werden konnte. Die Anwendung von UVA-Strahlung führte zu einem deutlich langsameren Abbau im Vergleich zu UVC-Bestrahlung. Auch die Zugabe von  $\text{TiO}_2$  zeigte keinen generellen positiven Effekt auf den Abbau, außer bei Verwendung der  $\text{TiO}_2$ -Modifikation P25. In den meisten Fällen jedoch, zum Beispiel bei Azithromycin und Tetracyclin, wurde um einen Faktor von zwei langsamere Geschwindigkeitskonstante beobachtet.

Der photoinduzierte Abbau der Antibiotika führte zu Photodegradanten, die mittels MS/MS strukturell aufgeklärt wurden. Unter den Produkten konnten auch bisher unbekannte Produkte identifiziert werden. Im Falle der Fluorchinolone konnten insgesamt 18 unbekannte Photodegradanten identifiziert werden, bei den Makroliden insgesamt 8. Bei den Sulfonamiden konnten bei Sulfamethazin und Sulfadiazin neue Hydroxyladdukte an beiden Ringsystemen nachgewiesen werden. Sulfamethoxazol und Sulfathiazol zeigten keine unbekannten Photodegradanten. Bei Tetracyclinen entstanden keine Photodegradanten. Die Photodegradanten wurden durch Modellierung ihrer Konzentrations-Zeit Kurven kinetisch untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Abbau der Wirkstoffe selbst nach einer Reaktionskinetik erster Ordnung beschrieben werden kann. Die entstandenen intermediären Produkte konnten als Zwischenprodukte einer Folge- bzw. Folge-Folge-Reaktion beschrieben werden. Durch diese Modellierung konnte nun erstmals auch das Verhalten der Abbauprodukte charakterisiert werden. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und der zugehörigen Halbwertszeiten ließ Rückschlüsse auf dem Verbleib in Gewässer schließen. Dies ist besonders für Kläranlagen wichtig, da

nicht nur eine Umweltgefahr vom Wirkstoff ausgehen könnte, sondern auch von den entstandenen Zwischenprodukten.

Um einzuschätzen, wie gefährlich die Photodegradationsprodukte für die Umwelt sind, wurden nach Bestimmung der MHK-Werte der Wirkstoffe gegen *Ps. fluorescens* und *B. subtilis* auch MHK-Bestimmungen in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit vorgenommen. Diese wurden miteinander verglichen und prediktive QSAR-Analysen an verschiedenen Organismen durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Wirksamkeit der meisten entstandenen Produkte als geringer als die der Ausgangssubstanzen vorhergesagt wurde. Entsprechende gegenteilige Aussagen in der wissenschaftlichen Literatur konnten hier nicht bestätigt werden. Somit könnte in dieser Hinsicht der photoinduzierte Abbau zur Eliminierung von Pharmazeutika in Kläranlagen eingesetzt werden. Die Photoprodukte der hier untersuchten Wirkstoffe schienen kein umweltgefährdendes Potential zu besitzen.

Für die Abschätzung der Abbaugeschwindigkeiten in MilliQ-Wasser im Vergleich zu Kläranlagenwasser, wurden Proben aus einer Kläranlage genommen und mit verschiedenen Antibiotika versetzt. Im Kläranlagenablauf wurden aufgrund von Matrixeffekten deutlich niedrigere Degradationsgeschwindigkeiten ermittelt. Es empfiehlt sich, die Proben länger zu bestrahlen als aus den hier ermittelten Geschwindigkeitskonstanten in reinem MilliQ-Wasser abgeleitet werden könnte.

In Proben aus einem Oberflächengewässer konnten verschiedene Pharmazeutika detektiert werden, wie Metoprolol, Sulfamethoxazol und Carbamazepin. Um die für Kläranlagen effektivsten experimentellen Bedingungen herauszufinden wurden Bestrahlungsversuche mit UVA- und UVC-Licht durchgeführt. Hier zeigte sich die effektivste Eliminierung der Pharmazeutika unter UVC-Bestrahlung und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe.

Für eine vierte Reinigungsstufe zur Eliminierung von Pharmazeutika, insbesondere Antibiotika, aus Gewässern empfiehlt sich die Anwendung von UVC-Bestrahlung in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe. Wichtig hierbei sind eine ausreichende Bestrahlungszeit, eine ausreichende Durchdringung der Lösung durch die Strahlung und ausreichende Intensität, damit alle Wirkstoffe und ihre Photodegradanten vollständig aus dem Wasser

eliminiert werden können und somit nach Einleitung des Klärwassers keine Gefahren für die Umwelt bestehen.

## Conclusion

In this study, sixteen antibiotics from four antibiotic classes were analyzed using photoinduced degradation and advanced oxidation processes (AOPs) to assess the effectiveness of a potential fourth purification stage in sewage treatment plants. To this purpose, a comprehensive literature survey demonstrated the presence and the environmental hazards of the antibiotic compounds and supported the selection of the antibiotics. The isolation and characterization of the model compounds and their degradation products were carried out using HPLC-ESI-IT-MS and HPLC-ESI-Q-TOF-MS. The focus laid on UVC irradiation, the effectiveness of which could be increased through addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The use of UVA radiation led to a much slower degradation as compared to UVC irradiation. The addition of  $\text{TiO}_2$  did not show a general accelerating effect on the degradation, except when using the  $\text{TiO}_2$  modification P25. However, in most cases, e.g. azithromycin and tetracycline, reaction rates slower by a factor of two were observed.

The photoinduced degradation of the antibiotics led to photodegradates that were structurally elucidated by MS / MS. Among the products, previously unknown products were identified. In the case of fluoroquinolones, a total of 18 unknown photodegradates was identified. With respect to the macrolides, eight novel degradates were detected and characterized. Novel hydroxyl adducts were identified on irradiation of sulfamethazine and sulfadiazine, the hydroxyl group located on both ring systems. No previously unknown photodegradates were found for sulfamethoxazole and sulfathiazole. No photodegradates at all were seen with tetracyclines. All photodegradates were kinetically investigated using computational modeling of the observed concentration-time profiles. It was shown that the degradation could be described by a first-order reaction kinetic model. The resulting photodegradates could be described as intermediate products of a follow-up or consecutive follow-up reaction. Using this approach, the behavior of degradation products has been characterized for the first time. The determination of the rate constants and the associated half-lives allowed conclusions to be drawn for water treatment. This is particularly important for sewage treatment plants, since environmental

hazards could not only arise from the active substance but also from the intermediate products.

In order to estimate the ecotoxicity of the photodegradation products, MICs were determined as a function of irradiation time and compared to the MIC values of the active substances against *Ps. fluorescens* and *B. subtilis*. In addition, predictive QSAR analyzes were carried out on different organisms. Here, it became clear that the efficacy of most of the resulting products was lower than that of the initial substances. Controversial statements in the scientific literature could not be confirmed here. Thus photoinduced degradation could be used in this regard for the elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants. The photoproducts of the investigated active substances did not appear to possess environmentally damaging potential.

For the estimation of degradation rates in MilliQ water compared to sewage water, samples were taken from a sewage treatment plant and various antibiotics were added. In the waste water plant effluent significantly lower degradation rates were determined due to matrix effects. It is hence advisable to irradiate samples longer than the rate constants determined in pure MilliQ water might suggest.

In samples from surface water, pharmaceuticals such as metoprolol, sulfamethoxazole and carbamazepine were detected. In order to predict the most effective experimental conditions for sewage treatment plants, irradiation experiments with UVA and UVC light were carried out. This indicated UVC irradiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition to be the most effective elimination of the pharmaceuticals.

As a fourth purification step for the elimination of pharmaceuticals from water bodies, especially antibiotics, the use of UVC irradiation in combination with addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is thus recommended. To apply a sufficient irradiation time is very important, further a sufficient penetration of the solution by the radiation and sufficient intensity so that all active substances and their photodegradates can be completely eliminated from the water. As a consequence, no environmental hazard would persist after the discharge of the sewage water using the suitable AOP conditions.



## Literaturverzeichnis

1. Kümmerer, K. Antibiotics in the aquatic environment - a review - part I. *Chemosphere* **75**, 417–34 (2009).
2. Tijani, J. O., Fatoba, O. O. & Petrik, L. F. A review of pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds: Sources, effects, removal, and detections. *Water. Air. Soil Pollut.* **224**, (2013).
3. Focazio, M. J. *et al.* A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. *Sci. Total Environ.* **402**, 201–216 (2008).
4. Li, W. C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.* **187**, 193–201 (2014).
5. Jones, O., Voulvoulis, N. & Lester, J. N. Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review. *Environ. Technol.* **22**, 1383–1394 (2001).
6. Li, J. *et al.* Occurrence and removal of antibiotics and the corresponding resistance genes in wastewater treatment plants: effluents influence to downstream water environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 6826–6835 (2016).
7. Martinez, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* **157**, 2893–902 (2009).
8. Ferro, G., Guarino, F., Castiglione, S. & Rizzo, L. Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. *Sci. Total Environ.* **560–561**, 29–35 (2016).
9. Martínez, J. L. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Sci. Mag* **321**, 365–368 (2008).
10. Depledge, M. Pharmaceuticals: Reduce drug waste in the environment. *Nature* **478**, 36–36 (2011).
11. Kümmerer, K. Significance of antibiotics in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 5–7 (2003).
12. World Health Organization. Antimicrobial resistance - Global Report on Surveillance. *Bull. World Health Organ.* **61**, 383–94 (2014).

13. AMR: a major European and Global challenge. Available at: [http://ec.europa.eu/dgs/health\\_food-safety/amr/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/amr/index_en.htm). (Accessed: 7th February 2017)
14. Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H. & Mawhinney, D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total Environ.* **366**, 772–783 (2006).
15. Lin, A. Y.-C. & Tsai, Y.-T. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Sci. Total Environ.* **407**, 3793–3802 (2009).
16. Kümmerer, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review. *Chemosphere* **45**, 957–69 (2001).
17. Saleem, M. Pharmaceutical Wastewater Treatment a Physicochemical Study. *J. Res. (Science)*, **18**, 125–134 (2007).
18. Deegan, A. M. *et al.* Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **8**, 649–666 (2011).
19. Flach, C. F. *et al.* Isolation of novel IncA/C and IncN fluoroquinolone resistance plasmids from an antibiotic-polluted lake. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 2709–2717 (2015).
20. Tremblay, J.-F. Spotlight grows on antibiotic pollution. *Chem. Eng. news* 18–19 (2017).
21. Gros, M., Petrovic, M. & Barceló, D. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (northeast Spain). *Environ. Toxicol. Chem.* **26**, 1553–1562 (2007).
22. Baquero, F., Martínez, J.-L. & Cantón, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, 260–5 (2008).
23. Bouki, C., Venieri, D. & Diamadopoulos, E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **91**, 1–9 (2013).
24. Michael, I. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res.* **47**, 957–95 (2013).

25. Wright, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1451–1470 (2005).
26. Bártíková, H., Podlipná, R. & Skálová, L. Chemosphere Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* **144**, 2290–2301 (2016).
27. Watkinson, J., Murby, E. J. & Costanzo, S. D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Res.* **41**, 4164–76 (2007).
28. Oppenländer, T. *Photochemical Purification of Water and Air: Advanced Oxidation Processes (AOPs): Principles, Reaction Mechanisms, Reactor Concepts (Chemistry)*. (WILEY-VCH Verlag, 2003).
29. Vallejo, M., Fresnedo San Román, M., Ortiz, I. & Irabien, A. Overview of the PCDD/Fs degradation potential and formation risk in the application of advanced oxidation processes (AOPs) to wastewater treatment. *Chemosphere* **118**, 44–56 (2015).
30. Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A. & Marotta, R. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catal. Today* **53**, 51–59 (1999).
31. An, T. *et al.* Kinetics and mechanism of advanced oxidation processes (AOPs) in degradation of ciprofloxacin in water. *Appl. Catal. B Environ.* **94**, 288–294 (2010).
32. Homem, V. & Santos, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices--a review. *J. Environ. Manage.* **92**, 2304–47 (2011).
33. Oller, I., Malato, S. & Sánchez-Pérez, J. A. Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination-A review. *Sci. Total Environ.* **409**, 4141–4166 (2011).
34. Wols, B., Hofman-Caris, C. H. M., Harmsen, D. J. H. & Beerendonk, E. F. Degradation of 40 selected pharmaceuticals by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Water Res.* **47**, 5876–88 (2013).
35. Kim, I., Yamashita, N. & Tanaka, H. Performance of UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. *J. Hazard. Mater.* **166**, 1134–1140 (2009).
36. Kim, I., Yamashita, N. & Tanaka, H. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments. *Chemosphere* **77**, 518–25 (2009).

37. Laoufi, N. A. *et al.* Removal of a Persistent Pharmaceutical Micropollutant by UV/TiO<sub>2</sub> Process Using an Immobilized Titanium Dioxide Catalyst: Parametric Study. *Chem. Eng. Trans.* **32**, 1951–1956 (2013).
38. Wang, C., Liu, H. & Qu, Y. TiO<sub>2</sub>-based photocatalytic process for purification of polluted water: Bridging fundamentals to applications. *J. Nanomater.* **2013**, (2013).
39. Parsons, S. *Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment*. (IWA Publishing, 2004).
40. Monteagudo, J. M., Durán, A. & San Martín, I. Mineralization of wastewater from the pharmaceutical industry containing chloride ions by UV photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe(II) and ultrasonic irradiation. *J. Environ. Manage.* **141**, 61–69 (2014).
41. Shahidi, D., Roy, R. & Azzouz, A. Advances in catalytic oxidation of organic pollutants - Prospects for thorough mineralization by natural clay catalysts. *Appl. Catal. B Environ.* **174–175**, 277–292 (2015).
42. Brillas, E. A review on the degradation of organic pollutants in waters by UV photoelectro-fenton and solar photoelectro-fenton. *J. Braz. Chem. Soc.* **25**, 393–417 (2014).
43. Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M. I. & Kümmerer, K. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere* **85**, 693–709 (2011).
44. Vasconcelos, T. G., Henriques, D. M., König, A., Martins, A. F. & Kümmerer, K. Photo-degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: Identification and biodegradability assessment of the primary by-products. *Chemosphere* **76**, 487–493 (2009).
45. Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P. & Ross, A. B. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (OH/O<sub>3</sub>) in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **17**, 513–886 (1988).
46. Yuan, F., Hu, C., Hu, X., Qu, J. & Yang, M. Degradation of selected pharmaceuticals in aqueous solution with UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Water Res.* **43**, 1766–1774 (2009).

47. Voigt, M., Savelsberg, C. & Jaeger, M. Photodegradation of the antibiotic spiramycin studied by high-performance liquid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **2248**, (2017).
48. Voigt, M. & Jaeger, M. On the photodegradation of azithromycin, erythromycin and tylosin and their transformation products – A kinetic study. *Sustain. Chem. Pharm.* **5**, 131–140 (2017).
49. Fatta-Kassinos, D., Meric, S. & Nikolaou, A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 251–75 (2011).
50. Yan, C. *et al.* Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment. *Environ. Pollut.* **175**, 22–29 (2013).
51. Sui, Q. *et al.* Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerg. Contam.* **1**, 14–24 (2015).
52. Fatta, D., Nikolaou, A., Achilleos, A. & Meric, S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. **26**, (2007).
53. Zuccato, E., Castiglioni, S. & Fanelli, R. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **122**, 205–209 (2005).
54. Sarmah, A. K., Meyer, M. T. & Boxall, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **65**, 725–759 (2006).
55. Tong, L., Li, P., Wang, Y. & Zhu, K. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* **74**, 1090–7 (2009).
56. Chen, K. Y., Yang, T. C. & Chang, S. Y. Determination of macrolide antibiotics using dispersive liquid-liquid microextraction followed by surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 1157–1160 (2012).
57. Esplugas, S., Bila, D. M., Krause, L. G. T. & Dezotti, M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *J. Hazard. Mater.* **149**, 631–42 (2007).

58. Kümmerer, K. Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt Identifizierung von Risikofeldern Abschlussbericht. 376 (2003).
59. Kemper, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* **8**, 1–13 (2008).
60. Voigt, M., Gold, A., Blaesing, C., Hoelscher, T. & Jaeger, M. Murky Waters. *Anal. Sci.* **49**, 36–41 (2007).
61. Lapworth, D. J., Baran, N., Stuart, M. E. & Ward, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.* **163**, 287–303 (2012).
62. Benotti, M. J. *et al.* Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 597–603 (2009).
63. Vöggtli, A. & Dür, A. S. PharmaWiki. Available at: <http://www.pharmawiki.ch>. (Accessed: 7th March 2017)
64. Lemmer, B. & Brune, K. *Pharmakotherapie Klinische Pharmakologie*. (Springer Medizin Verlag, 2010).
65. Albini, A. & Monti, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem. Soc. Rev.* **32**, 238 (2003).
66. de Guidi, G., Bracchitta, G. & Catalfo, A. Photosensitization reactions of fluoroquinolones and their biological consequences. *Photochem. Photobiol.* **87**, 1214–29 (2011).
67. Sturini, M. *et al.* Sunlight-induced degradation of fluoroquinolones in wastewater effluent: Photoproducts identification and toxicity. *Chemosphere* **134**, 313–318 (2015).
68. Chu, D. T. W. & Fernandes, P. B. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 131–135 (1989).
69. Sárközy, G. Quinolones: A class of antimicrobial agents. *Vet. Med. (Praha)*. **46**, 257–274 (2001).
70. Andersson, M. I. Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 1–11 (2003).
71. He, K. & Blaney, L. Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater. *J. Hazard. Mater.* **282**, 96–105 (2015).

- 
72. Golet, E. M., Alder, a C., Hartmann, a, Ternes, T. a & Giger, W. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chem.* **73**, 3632–3638 (2001).
  73. Karthikeyan, K. G. & Meyer, M. T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Sci. Total Environ.* **361**, 196–207 (2006).
  74. Prieto-Rodriguez, L. *et al.* Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO<sub>2</sub> concentrations. *J. Hazard. Mater.* **211–212**, 131–137 (2012).
  75. López-Serna, R., Petrović, M. & Barceló, D. Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)-tandem mass spectrometry (MS/MS). *Chemosphere* **85**, 1390–9 (2011).
  76. Christian, T. *et al.* Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. *Acta Hydrochim. hydrobiol.* **31**, 36–44 (2003).
  77. Delaforge, M., Jaouen, M. & Mansuy, D. Dual effects of macrolide antibiotics on rat liver cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 2309–2318 (1983).
  78. Hansen, J. L. *et al.* The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell* **10**, 117–128 (2002).
  79. Zuckerman, J. M. Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **18**, 621–649 (2004).
  80. Sacher, F. & Thomas, F. Pharmaceuticals in groundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J. Chromatogr.* **938**, 199–210 (2001).
  81. Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M. & Guwy, a J. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1161**, 132–45 (2007).
  82. De la Cruz, N. *et al.* Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. *Water Res.* **46**, 1947–57 (2012).
-

83. Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J. & Cai, Y. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere* **89**, 1307–15 (2012).
84. Li, N., Zhang, X., Wu, W. & Zhao, X. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of antibiotics in the reservoirs in North China. *Chemosphere* **111**, 327–335 (2014).
85. Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M. & Fanelli, R. Source , occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **179**, 1042–1048 (2010).
86. Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F. & Calamari, D. Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 357–363 (2006).
87. Hassanzadeh, A., Helliwell, M. & Barber, J. Determination of the stereochemistry of anhydroerythromycin A, the principal degradation product of the antibiotic erythromycin A. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 1014–1019 (2006).
88. Hassanzadeh, A., Barber, J., Morris, G. & Gorry, P. Mechanism for the degradation of erythromycin A and erythromycin A 2'-ethyl succinate in acidic aqueous solution. *J. Phys. Chem. A* **111**, 10098–10104 (2007).
89. Atkins, P. J., Herbert, T. O. & Jones, N. B. Kinetic studies on the decomposition of erythromycin A in aqueous acidic and neutral buffers. *Int. J. Pharm.* **30**, 199–207 (1986).
90. Chen, B. M. *et al.* Quantitative determination of azithromycin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in a bioequivalence study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42**, 480–487 (2006).
91. Debremaeker, D. *et al.* Analysis of unknown compounds in azithromycin bulk samples with liquid chromatography coupled to ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 342–350 (2003).
92. Fiese, E. F. & Steffen, S. H. Comparison of the acid stability of azithromycin and erythromycin A. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**, 39–47 (1990).
93. Loke, M. L., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B. & Tjørnelund, J. Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere* **40**, 759–765 (2000).



94. Mordi, M. N., Pelta, M. D., Boote, V., Morris, G. a. & Barber, J. Acid-catalyzed degradation of clarithromycin and erythromycin B: A comparative study using NMR spectroscopy. *J. Med. Chem.* **43**, 467–474 (2000).
95. Zhang, Y. *et al.* Aspects of Degradation Kinetics of Azithromycin in Aqueous Solution. *Chromatographia* **70**, 67–73 (2009).
96. Voigt, M., Savelsberg, C. & Jaeger, M. Photodegradation of the antibiotic spiramycin studied by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Toxicol. Environ. Chem.* **99**, 624–640 (2017).
97. Wang, C. *et al.* Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Water Res.* **45**, 1818–1828 (2011).
98. Korst, J. J. *et al.* The Total Synthesis of dZ-6-Dernethyl-6-deoxytetracycline. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 439–457 (1968).
99. McCormick, J. R. D. *et al.* Studies of the reversible epimerization occurring in the tetracycline family. The preparation, properties and proof of structure of some 4-epi-tetracyclines. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2849–2858 (1957).
100. Pereira-Maia, E. C. *et al.* Tetraciclinas e glicilciclinas: Uma visão geral. *Quim. Nova* **33**, 700–706 (2010).
101. Borghi, A. A. & Palma, M. S. A. Tetracycline: Production, waste treatment and environmental impact assessment. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **50**, 25–40 (2014).
102. Rizzo, L., Fiorentino, A. & Anselmo, A. Advanced treatment of urban wastewater by UV radiation: Effect on antibiotics and antibiotic-resistant E. coli strains. *Chemosphere* **92**, 171–6 (2013).
103. Sharma, V. K., Johnson, N., Cizmas, L., Mcdonald, T. J. & Kim, H. Chemosphere A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere* **150**, 702–714 (2016).
104. Studies, A. ADVANCED OXIDATION PROCESSES ( AOPs ) APPLIED FOR WASTEWATER AND DRINKING WATER TREATMENT . ELIMINATION OF PHARMACEUTICALS. **1**, 63–74 (2011).

105. Mohapatra, D. P., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Picard, P. & Surampalli, R. Y. Analysis and advanced oxidation treatment of a persistent pharmaceutical compound in wastewater and wastewater sludge-carbamazepine. *Sci. Total Environ.* **470–471**, 58–75 (2014).
106. Díaz-Garduño, B., Rueda-Márquez, J. J., Manzano, M. A., Garrido-Pérez, C. & Martín-Díaz, M. L. Are combined AOPs effective for toxicity reduction in receiving marine environment? Suitability of battery of bioassays for wastewater treatment plant (WWTP) effluent as an ecotoxicological assessment. *Mar. Environ. Res.* **114**, 1–11 (2016).
107. Moreira, F. C. *et al.* Tertiary treatment of a municipal wastewater toward pharmaceuticals removal by chemical and electrochemical advanced oxidation processes. *Water Res.* **105**, 251–263 (2016).
108. Rizzo, L., Della Sala, A., Fiorentino, A. & Li Puma, G. Disinfection of urban wastewater by solar driven and UV lamp - TiO<sub>2</sub> photocatalysis: Effect on a multi drug resistant *Escherichia coli* strain. *Water Res.* **53**, 145–152 (2014).
109. Tijani, J. O., Fatoba, O. O., Madzivire, G. & Petrik, L. F. A review of combined advanced oxidation technologies for the removal of organic pollutants from water. *Water. Air. Soil Pollut.* **225**, (2014).
110. Petrovic, M. & Barceló, D. LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* **26**, 486–493 (2007).
111. Samet, Y., Hmani, E. & Abdelhédi, R. Fenton and solar photo-Fenton processes for the removal of chlorpyrifos insecticide in wastewater. *Water SA* **38**, 537–542 (2012).
112. Ruppert, G., Heisler, G. & Bauer, R. The photo-Fenton reaction - wastewater treatment process an effective photochemical. *J. Photochem Photobiol. A: Chem.* **73**, (1993).
113. Babuponnusami, A. & Muthukumar, K. A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *J. Environ. Chem. Eng.* **2**, 557–572 (2014).
114. Zoschke, K., Börnick, H. & Worch, E. Vacuum-UV radiation at 185 nm in water treatment-a review. *Water Res.* **52**, 131–45 (2014).

115. Szabó, R. K. Decomposition of some pharmaceuticals by Advanced Oxidation Processes. (University of Szeged, 2010).
116. Crapulli, F., Santoro, D., Sasges, M. R. & Ray, a K. Mechanistic modeling of vacuum UV advanced oxidation process in an annular photoreactor. *Water Res.* **64**, 209–25 (2014).
117. Kim, I. & Tanaka, H. Photodegradation characteristics of PPCPs in water with UV treatment. *Environ. Int.* **35**, 793–802 (2009).
118. Heit, G., Neuner, A., Saugy, P. & Braun, M. Vacuum-UV (172 nm) Actinometry . The Quantum Yield of the Photolysis of Water. *J. Phys. Chem. A* **5639**, 5551–5561 (1998).
119. Ratpukdi, T. Degradation of Paracetamol and Norfloxacin in Aqueous Solution Using Vacuum Ultraviolet (VUV) Process. *J. Clean Energy Technol.* **2**, 168–170 (2014).
120. Baxendale, J. H. The Flash Photolysis of Water and Aqueous Solutions. *Radiat. Res.* **17**, 312–326 (1962).
121. Black, G. & Porter, G. Vacuum ultra-violet flash photolysis of water vapour. *Proc. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Sci.* **266**, 1–31 (1962).
122. Szabó, R. K. *et al.* Phototransformation of ibuprofen and ketoprofen in aqueous solutions. *Chemosphere* **84**, 1658–63 (2011).
123. Atkins, P. & de Paula, J. Physical Chemistry 9Th Edition. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 1689–1699 (2013).
124. Wedler, G. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. (WILEY-VCH Verlag, 2004).
125. Liu, X., Fang, L., Zhou, Y., Zhang, T. & Shao, Y. Comparison of UV/PDS and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes for the degradation of atenolol in water Authors: *J. Environ. Sci.* **25**, (2013).
126. Sun, L. & Bolton, J. R. Determination of the Quantum Yield for the Photochemical Generation of Hydroxyl Radicals in TiO<sub>2</sub> Suspensions. *J. Phys. Chem.* **100**, 4127–4134 (1996).
127. Giannakis, S. *et al.* Effect of advanced oxidation processes on the micropollutants and the effluent organic matter contained in municipal wastewater previously treated by three different secondary methods. *Water Res.* **84**, 295–306 (2015).

128. Gligorovski, S., Strekowski, R., Barbati, S. & Vione, D. Environmental Implications of Hydroxyl Radicals (OH). *Chem. Rev.* **115**, 13051–13092 (2015).
129. Huang, C. P., Dong, C. & Tang, Z. Advanced chemical oxidation: Its present role and potential future in hazardous waste treatment. *Waste Manag.* **13**, 361–377 (1993).
130. Li, C., Wang, F. & Yu, J. C. Semiconductor/biomolecular composites for solar energy applications. *Energy Environ. Sci.* **4**, 100 (2011).
131. Kochany, J. & Bolton, J. of aqueous organic pollutants. 1. EPR spin-trapping technique for the determination of hydroxyl radical rate constants in the photooxidation of chlorophenols following. *J. Phys. Chem.* **95**, 5116–5120 (1991).
132. Kochany, J. & Bolton, J. R. Mechanism of photodegradation of aqueous organic pollutants. 2. Measurement of the primary rate constants for reaction of hydroxyl radicals with benzene and some halobenzenes using an EPR spin-trapping method following the photolysis of hydrogen peroxide. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 262–265 (1992).
133. Nasuhoglu, D., Rodayan, A., Berk, D. & Yargeau, V. Removal of the antibiotic levofloxacin (LEVO) in water by ozonation and TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Chem. Eng. J.* **189–190**, 41–48 (2012).
134. Lutterbeck, C. A., Machado, E. L. & Kümmerer, K. Photodegradation of the antineoplastic cyclophosphamide: A comparative study of the efficiencies of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/Fe(2+)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/TiO<sub>2</sub> processes. *Chemosphere* **120C**, 538–546 (2014).
135. Tseng, D.-H., Juang, L.-C. & Huang, H.-H. Effect of Oxygen and Hydrogen Peroxide on the Photocatalytic Degradation of Monochlorobenzene in Aqueous Suspension. *Int. J. Photoenergy* **2012**, 1–9 (2012).
136. Mauser, H. *Formale Kinetik*. (Bertelsmann-Universitätsverlag, 1974).
137. Connors, K. A. *Chemical Kinetics The Study of Reaction Rates in Solution*. (VCH Verlagsgesellschaft, 1990).
138. Mazellier, P., Méité, L. & De Laat, J. Photodegradation of the steroid hormones 17beta-estradiol (E2) and 17alpha-ethinylestradiol (EE2) in dilute aqueous solution. *Chemosphere* **73**, 1216–23 (2008).

139. Leifer, A. *The kinetics of environmental aquatic photochemistry: theory and practice*. (American Chemical Society, 1988).
140. Chan, P. Y., Gamal El-Din, M. & Bolton, J. R. A solar-driven UV/Chlorine advanced oxidation process. *Water Res.* **46**, 5672–82 (2012).
141. Li, K. *et al.* Concentration-dependent photodegradation kinetics and hydroxyl-radical oxidation of phenicol antibiotics. *Chemosphere* **111**, 278–282 (2014).
142. Fernández, R. L., McDonald, J. a., Khan, S. J. & Le-Clech, P. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals by a submerged membrane photocatalysis reactor (MPR). *Sep. Purif. Technol.* **127**, 131–139 (2014).
143. Jung, Y. J. *et al.* Removal of amoxicillin by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes. *Sci. Total Environ.* **420**, 160–7 (2012).
144. Otto, M. *Chemometrie Statistik und Computereinsatz in der Analytik*. (VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1997).
145. Kessler, W. *Multivariate Datenanalyse*. (WILEY-VCH, 2013).
146. Pomerantsev, A. L. *Chemometrics in Excel*. (JohnWiley & Sons, Inc, 2014).
147. Pruscha, H. *Statistisches Methodenbuch*. (2015).
148. Mas, S., de Juan, A., Tauler, R., Olivieri, A. C. & Escandar, G. M. Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review. *Talanta* **80**, 1052–1067 (2010).
149. Fick, J. *et al.* Selection of Antibiotics : A Chemometric Approach . Method. 143–150
150. Kruhlak, N. L., Contrera, J. F., Benz, R. D. & Matthews, E. J. Progress in QSAR toxicity screening of pharmaceutical impurities and other FDA regulated products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 43–55 (2007).
151. Vracko, M. *Mathematical (Structural) Descriptors in QSAR: Applications in Drug Design and Environmental Toxicology. Advances in Mathematical Chemistry and Applications: Revised Edition*, (2016).
152. Zhu, H., Shen, Z., Tang, Q., Ji, W. & Jia, L. Degradation mechanism study of organic pollutants in ozonation process by QSAR analysis. *Chem. Eng. J.* **255**, 431–436 (2014).
153. Wold, S., Sjöström, M. & Eriksson, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **58**, 109–130 (2001).

154. Rouvray, D. & Bonchev, D. *Chemical Graph Theory: Introduction and Fundamentals*. (1991).
155. Puzyn, Tomasz, Gajewicz, Agnieszka, Leszczynska, Danuta & Leszczynski, Jerzy. in *Recent Advances in QSAR Studies* (eds. Puzyn, T., Leszczynski, J. & Cronin, M. T. D.) **8**, 367–379 (Springer, 2010).
156. Gross, U. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie 129 Tabellen [Medilearn-Gütesiegel]*. (2009).
157. Gerardi, M. H. *Wastewater Bacteria*. (John Wiley & Sons, Inc., 2006).
158. Cypionka, H. *Grundlagen der Mikrobiologie. Media* (Springer, 2010).
159. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank. *DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration* 668–672 (2006). doi:10.1093/nar/gkj067
160. Sulfathiazole. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5340* Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5340>. (Accessed: 3rd May 2017)
161. Wenzel, S. C. & Müller, R. *Industrielle Mikrobiologie. Carbohydrate Research* **95**, (Springer Spektrum, 2013).
162. Kuhn, H. ., Braslavsky, S. E. & Schmidt, R. Chemical Actinometry. *IUPAC Tech. Rep.* 1–47 (2004).
163. Hatchard, C. G. & Parker, C. A New Sensitive Chemical Actinometer. II. Potassium Ferrioxalate as a Standard Chemical Actinometer. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **235**, 518–536 (1956).
164. EUCAST, E. C. O. A. S. T. ISO 20776-1:2007. (2007).
165. Šćepanović, M. *et al.* Photocatalytic degradation of metoprolol in water suspension of TiO<sub>2</sub> nanopowders prepared using sol-gel route. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **61**, 390–402 (2012).
166. Buda, S. *et al.* *Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2014/15*. (2015).
167. Salma, A., Thoröe-boveleth, S., Schmidt, T. C. & Tuerk, J. Dependence of transformation product formation on pH during photolytic and photocatalytic degradation of ciprofloxacin. *J. Hazard. Mater.* **313**, 49–59 (2016).

- 
168. Foroumadi, A., Emami, S., Mehni, M., Moshafi, M. H. & Shafiee, A. Synthesis and antibacterial activity of N-[2-(5-bromothiophen-2-yl)-2-oxoethyl] and N-[(2-5-bromothiophen-2-yl)-2-oximinoethyl] derivatives of piperazinyl quinolones. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **15**, 4536–4539 (2005).
169. Foroumadi, A., Mansouri, S., Kiani, Z. & Rahmani, A. Synthesis and in vitro antibacterial evaluation of N-[5-(5-nitro-2-thienyl)-1,3,4-thiadiazole-2-yl] piperazinyl quinolones. *Eur. J. Med. Chem.* **38**, 851–854 (2003).
170. Goyal, A. & Jain, S. Syntheses and Antibacterial Studies of Some. **2013**, (2013).
171. Jain, S., Kumar, A., Kumar, M. & Jain, N. Synthesis and antibacterial studies of 2-aryl-3-alkanamido-4H-thiazolidin-4-one derivatives. *Arab. J. Chem.* **9**, S290–S295 (2016).
172. Andrews, J. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 5–16 (2001).
173. Sturini, M. *et al.* Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. *Water Res.* **46**, 5575–82 (2012).
174. EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Available at: [www.eucast.org](http://www.eucast.org). (Accessed: 31st January 2017)
175. Shi, Y. & Zhou, C. H. Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **21**, 956–960 (2011).
176. Ferretti, M. D., Neto, A. T., Morel, A. F., Kaufman, T. S. & Larghi, E. L. Synthesis of symmetrically substituted 3,3-dibenzyl-4-hydroxy-3,4-dihydro-1H-quinolin-2-ones, as novel quinoline derivatives with antibacterial activity. *Eur. J. Med. Chem.* **81**, 253–266 (2014).
177. Gehrke, I. T. S. *et al.* Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **148**, 486–491 (2013).
178. Guruswamy, B., Arul, R., Chaitanya, M. V. S. R. K. & Praveen Kumar Darsi, S. S. Design, Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Novel Tricyclic Benzoxazine Fluoroquinolones under Conventional and Microwave Methods B. *J. Heterocycl. Chem.* **52**, 532–538 (2015).
179. Ogata, M. *et al.* Mechanism of action of dipropofol and synergistic action with other antibacterial agents in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1773–5 (2005).
-

180. Joshi, R. K. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) from Western Ghats of North West Karnataka, India. *Anc. Sci. Life* **33**, 151–6 (2014).
181. Mawabo, I. K., Noumedem, J. A. K., Kuate, J. R. & Kuete, V. Tetracycline improved the efficiency of other antimicrobials against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. *J. Infect. Public Health* **8**, 226–233 (2015).
182. Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Martins, A. & Pintado, M. Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 466–475 (2012).
183. Gao, C. *et al.* Investigation of antibacterial activity of aspidin BB against *Propionibacterium acnes*. *Arch. Dermatol. Res.* **308**, 79–86 (2016).
184. Bahnous, M. *et al.* Synthesis, crystal structure and antibacterial activity of new highly functionalized ionic compounds based on the imidazole nucleus. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 1274–8 (2013).
185. Bollenbach, T. & Kishony, R. Resolution of Gene Regulatory Conflicts Caused by Combinations of Antibiotics. *Mol. Cell* **42**, 413–425 (2011).
186. Mondal, S., Mandal, S. M., Mondal, T. K. & Sinha, C. Spectroscopic characterization, antimicrobial activity, DFT computation and docking studies of sulfonamide Schiff bases. *J. Mol. Struct.* **1127**, 557–567 (2017).
187. Argyropoulou, I., Geronikaki, A., Vicini, P. & Zani, F. Synthesis and biological evaluation of sulfonamide thiazole and benzothiazole derivatives as antimicrobial agents. *Arkivoc* **2009**, 89–102 (2009).
188. Septama, A. W. & Panichayupakaranant, P. Synergistic effect of artocarpin on antibacterial activity of some antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. *Pharm. Biol.* **209**, 1–6 (2015).
189. Fasani, E. *et al.* The photochemistry of lomefloxacin. An aromatic carbene as the key intermediate in photodecomposition. *Chem. Commun.* 1329–1330 (1997). doi:10.1039/a703226i
190. Laidler, K. J. *Chemical Kinetics*. (Harper & Row, 1987).



191. Batchu, S. R., Panditi, V. R., O'Shea, K. E. & Gardinali, P. R. Photodegradation of antibiotics under simulated solar radiation: implications for their environmental fate. *Sci. Total Environ.* **470–471**, 299–310 (2014).
192. Calza, P., Marchisio, S., Medana, C. & Baiocchi, C. Fate of antibacterial spiramycin in river waters. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 1539–1550 (2010).
193. Alatrache, A., Laoufi, N. A., Pons, M. N., Van Deik, J. & Zahraa, O. Tylosin abatement in water by photocatalytic process. *Water Sci. Technol.* **62**, 435–441 (2010).
194. Tassalit, D., Laoufi, A. N. & Bentahar, F. Photocatalytic Deterioration of Tylosin in an Aqueous Suspension Using UV/TiO<sub>2</sub>. *Sci. Adv. Mater.* **3**, 944–948 (2011).
195. Trovó, A. G. *et al.* Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation. *Water Res.* **43**, 3922–31 (2009).
196. Trovó, A. G., Nogueira, R. F. P., Agüera, A., Sirtori, C. & Fernández-Alba, A. R. Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: persistence, toxicity and photoproducts assessment. *Chemosphere* **77**, 1292–8 (2009).
197. Zhou, W. & Moore, D. E. Photochemical decomposition of sulfamethoxazole. *Int. J. Pharm.* **110**, 55–63 (1994).
198. Babić, S., Zrnčić, M., Ljubas, D., Čurković, L. & Škorić, I. Photolytic and thin TiO<sub>2</sub> film assisted photocatalytic degradation of sulfamethazine in aqueous solution. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 11372–11386 (2015).
199. Batista, A. P. S., Pires, F. C. C. & Teixeira, A. C. S. C. The role of reactive oxygen species in sulfamethazine degradation using UV-based technologies and products identification. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **290**, 77–85 (2014).
200. Fukahori, S. & Fujiwara, T. Photocatalytic decomposition behavior and reaction pathway of sulfamethazine antibiotic using TiO<sub>2</sub>. *J. Environ. Manage.* **157**, 103–110 (2015).
201. Gao, J., Hedman, C., Liu, C., Guo, T. & Pedersen, J. a. Transformation of sulfamethazine by manganese oxide in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 2642–2651 (2012).

202. Li, Y., Wei, X., Chen, J., Xie, H. & Zhang, Y. nan. Photodegradation mechanism of sulfonamides with excited triplet state dissolved organic matter: A case of sulfadiazine with 4-carboxybenzophenone as a proxy. *J. Hazard. Mater.* **290**, 9–15 (2015).
203. Sukul, P., Lamshöft, M., Zühlke, S. & Spiteller, M. Photolysis of <sup>14</sup>C-sulfadiazine in water and manure. *Chemosphere* **71**, 717–725 (2008).
204. Brausch, J. M., Connors, K. A., Brooks, B. W. & Rand, G. M. in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 218* (ed. Whitacre, D. M.) 1–99 (Springer US, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-3137-4\_1
205. De Liguoro, M., Fioretto, B., Poltronieri, C. & Gallina, G. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim. *Chemosphere* **75**, 1519–1524 (2009).
206. Jung, J., Kim, Y., Kim, J., Jeong, D. H. & Choi, K. Environmental levels of ultraviolet light potentiate the toxicity of sulfonamide antibiotics in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* **17**, 37–45 (2008).
207. Haddad, T. & Kümmerer, K. Characterization of photo-transformation products of the antibiotic drug Ciprofloxacin with liquid chromatography-tandem mass spectrometry in combination with accurate mass determination using an LTQ-Orbitrap. *Chemosphere* **115**, 40–6 (2014).
208. Sturini, M. *et al.* Photolytic and photocatalytic degradation of fluoroquinolones in untreated river water under natural sunlight. *Appl. Catal. B Environ.* **119–120**, 32–39 (2012).
209. Budai, M. *et al.* UV light induced photodegradation of liposome encapsulated fluoroquinolones: An MS study. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **198**, 268–273 (2008).
210. Cardoza, L. A. *et al.* Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems. *Water. Air. Soil Pollut.* **161**, 383–398 (2005).
211. Andreu, V., Blasco, C. & Picó, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* **26**, 534–556 (2007).

212. Porras, J. *et al.* Role of humic substances in the degradation pathways and residual antibacterial activity during the photodecomposition of the antibiotic ciprofloxacin in water. **94**, (2016).
213. Sturini, M. *et al.* Environmental photochemistry of fluoroquinolones in soil and in aqueous soil suspensions under solar light. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 13215–13221 (2014).
214. Paul, T., Dodd, M. C. & Strathmann, T. J. Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: transformation products and residual antibacterial activity. *Water Res.* **44**, 3121–32 (2010).
215. Prieto, A., Möder, M., Rodil, R., Adrian, L. & Marco-Urrea, E. Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products. *Bioresour. Technol.* **102**, 10987–95 (2011).
216. Torniainen, K., Askolin, C. P. & Mattinen, J. Isolation and structure elucidation of an intermediate in the photodegradation of ciprofloxacin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**, 439–45 (1997).
217. Liu, C., Nanaboina, V., Korshin, G. V & Jiang, W. Spectroscopic study of degradation products of ciprofloxacin, norfloxacin and lomefloxacin formed in ozonated wastewater. *Water Res.* **46**, 5235–46 (2012).
218. Durán-álvarez, J. C., Avella, E., Ramírez-zamora, R. M. & Zanella, R. Photocatalytic degradation of ciprofloxacin using mono- ( Au , Ag and Cu ) and bi- ( Au – Ag and Au – Cu ) metallic nanoparticles supported on TiO<sub>2</sub> under UV-C and simulated sunlight. *Catal. Today* **266**, 175–187 (2016).
219. Hubicka, U., Zmudzki, P., Talik, P., Zuromska-Witek, B. & Krzek, J. Photodegradation assessment of ciprofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin and ofloxacin in the presence of excipients from tablets by UPLC-MS/MS and DSC. *Chem. Cent. J.* **7**, 133 (2013).
220. Babić, S., Periša, M. & Škorić, I. Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media. *Chemosphere* **91**, 1635–42 (2013).
221. Ge, L. *et al.* New insights into the aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics: Direct photodegradation, hydroxyl-radical oxidation, and antibacterial activity changes. *Sci. Total Environ.* **527–528**, 12–17 (2015).

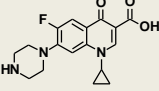
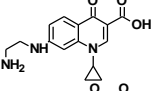
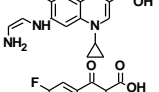
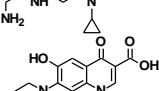
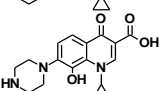
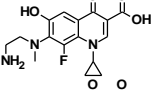
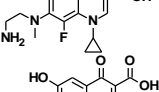
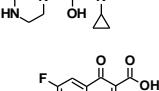
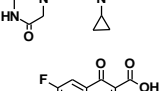
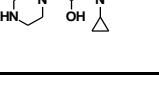

- 222. Witte, B. De *et al.* Levofloxacin ozonation in water: rate determining process parameters and reaction pathway elucidation. *Chemosphere* **76**, 683–9 (2009).
- 223. Hamdi El Najjar, N., Touffet, A., Deborde, M., Journal, R. & Leitner, N. K. V. Levofloxacin oxidation by ozone and hydroxyl radicals: Kinetic study, transformation products and toxicity. *Chemosphere* **93**, 604–611 (2013).
- 224. Gong, Y. *et al.* Partial degradation of levofloxacin for biodegradability improvement by electro-Fenton process using an activated carbon fiber felt cathode. *J. Hazard. Mater.* **304**, 320–328 (2016).
- 225. Lam, M. W. & Mabury, S. a. Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquat. Sci.* **67**, 177–188 (2005).
- 226. Fasani, E., Albini, A., Mella, M., Rampi, M. & Negra, F. B. Light and drugs: the photochemistry of fluoroquinolone antibiotics. *Int. J. Photoenergy* **1**, 7–11 (1999).
- 227. Fasani, E. *et al.* Inter- and intramolecular photochemical reactions of fleroxacin. *Org. Lett.* **11**, 1875–8 (2009).
- 228. Liang, C. *et al.* Impact of dissolved organic matter on the photolysis of the ionizable antibiotic norfloxacin. *J. Environ. Sci. (China)* **27**, 115–23 (2015).
- 229. Maia, A. S. *et al.* Degradation of fluoroquinolone antibiotics and identification of metabolites/transformation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1333**, 87–98 (2014).

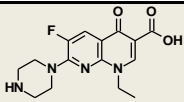
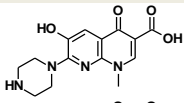
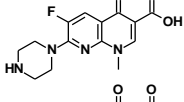
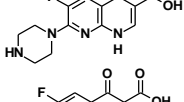
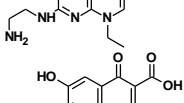
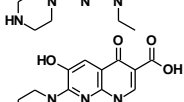
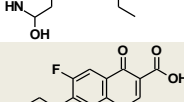
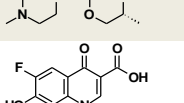
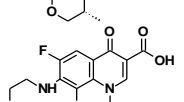
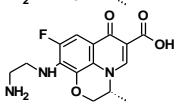
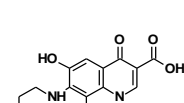
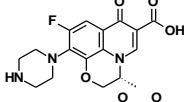
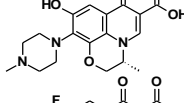
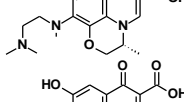
## Anhang

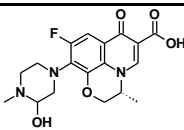
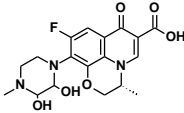
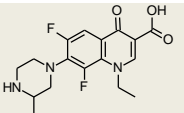
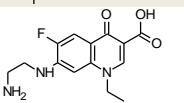
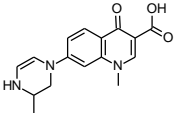
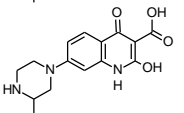
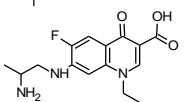
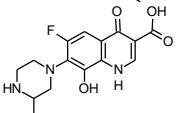
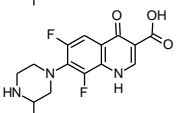
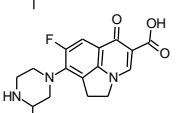
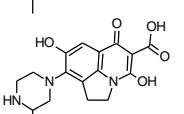
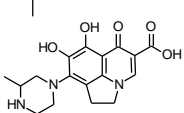
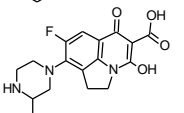
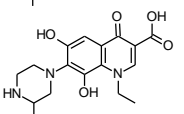
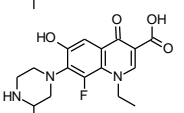
### Anhang A Fluorchinolone

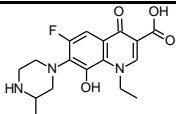
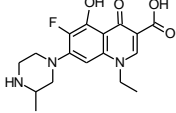
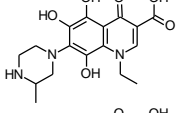
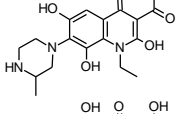
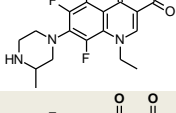
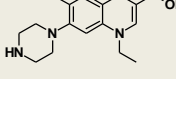
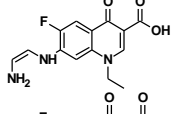
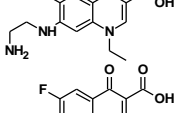
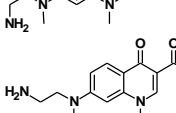
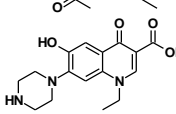
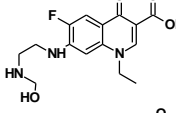
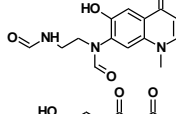
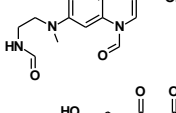
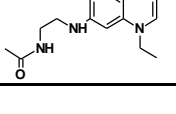

Die mit MS<sup>n</sup>-Experimenten identifizierten Produkte sind in Tabelle A.1 dargestellt und die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten in Tabelle A.2.

**Tab. A.1** Mittels MS<sup>n</sup> identifizierte Wirkstoffe und deren Photodegradanten, die durch UVA- bzw. UVC-Bestrahlung entstanden sind. Die Analysen erfolgten mittels HPLC-ESI-IT-MS.

<i>R<sub>t</sub></i> [min]	[M+H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>	Struktur- vorschlag	Referenz
<b>8.8</b> <b>Cipro- floxacin</b>	332	288	268		
<b>5.5</b>	288	270	200		44,167,191,207–212
<b>2.3</b>	304	261			211
<b>6.1</b>	306	288			31,44,167,207–211,213–218
<b>4.6</b>	330	286	243		44,167,191,207–212,214,218
<b>5.9</b>	330				167,219
<b>2.4</b>	336				217
<b>1.2</b>	338				217
<b>2.1</b>	346	318	247		167,191,207,208,213,217,220
<b>6.5</b>	346				
<b>8.3</b>	348	304	261		31,167,191,207,213,215,217,219

<b>6.5</b>	321	303		
<b>Enoxacin</b>				
<b>1.5</b>	305	287		diese Arbeit
<b>1.8</b>	307	289		diese Arbeit
<b>5.2</b>	293	273		diese Arbeit
<b>5.4</b>	295	277		diese Arbeit
<b>5.8</b>	319	301		diese Arbeit
<b>8.1</b>	335	317		diese Arbeit
<b>6.2</b>	362	318	261	
<b>Levofloxacin</b>				
<b>1.1</b>	280			221
<b>5.3</b>	310			diese Arbeit
<b>1.2</b>	322			208,213
<b>6.1</b>	322			
<b>1.8</b>	334	277	235	diese Arbeit
<b>1.9</b>	338	310	292	222
<b>3.8</b>	338			222
<b>7.2</b>	348	304	261	208,213,222,223
<b>1.1</b>	360	318		208,213,221
<b>2.6</b>	364			208,222,224
<b>5.2</b>	376			222

1.6	378	292		221,222,224,225	
1.6	394			221	
10.0 Lome- floxacin	352	308	265		
5.8	294	276			diese Arbeit
1.6	300				diese Arbeit
1.8	304				diese Arbeit
7.3	308	290	270		189,209
2.7	322				diese Arbeit
3.2	324	281	253		diese Arbeit
5.8	332	288	245		189,209,226,227
2.1	346				diese Arbeit
5.0					
3.0	348	330	304		209
7.0	348				
3.8	350				209

6.7	350	306	263		
9.4	350	332	267		
4.3	364	346	195		diese Arbeit
7.0	364				
1.8	368				217
9.0 Nor- floxacin	320	276	256		
1.0	211	177			diese Arbeit
1.9	292	272	226		diese Arbeit
1.6	294				215,217,219,228,229
5.8	294	276	256		
4.0	318	300			228,229
5.9	318				
1.6	324				217
2.1	334	306	235		217,220,229
6.3	334				
12.7	334				



**Tab. A.2**      **Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Photodegradanten der Fluorchinolone bei pH 3-4, pH 6-7 und pH 8-9**

Wirkstoff	pH	Photo-degradant	$k_1$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k_2$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min	$k_3$ /min <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ /min
<b>Cipro-floxacin</b>	3-4	336 $R_t$ 2.4 min	0.18	3.85	0.21	3.30	3.23	0.21
		346 $R_t$ 6.5 min	0.07	9.90	0.68	1.02	1.40	0.50
	6-7	288 $R_t$ 5.5 min	0.16	4.33	1.16	0.60	1.19	0.58
		304 $R_t$ 2.3 min	0.08	8.66	0.97	0.71	0.96	0.72
		330 $R_t$ 4.6 min	0.10	6.93	1.34	0.52	1.36	0.51
	8-9	306 $R_t$ 6.1 min	0.23	3.01	0.74	0.94	8.94	0.08
		330 $R_t$ 5.9 min	0.21	3.30	0.21	3.30	1.60	0.43
		336 $R_t$ 2.4 min	0.28	2.48	0.29	2.39	0.87	0.80
<b>Enoxacin</b>	3-4	295 $R_t$ 5.4 min	0.20	3.47	0.39	1.78	-	-
		305 $R_t$ 1.5 min	0.23	3.02	0.23	3.02	-	-
		307 $R_t$ 1.8 min	0.15	4.69	0.15	4.69	-	-
		319 $R_t$ 5.8 min	0.25	2.77	0.57	1.22	-	-
	6-7	293 $R_t$ 5.2 min	0.20	3.47	0.43	1.62	-	-
		307 $R_t$ 1.8 min	0.21	3.29	0.21	3.29	-	-
		319 $R_t$ 5.8 min	0.19	3.65	0.43	1.62	-	-
		335 $R_t$ 8.1 min	0.23	3.05	0.85	0.81	-	-
	8-9	295 $R_t$ 5.4 min	0.42	1.65	0.42	1.65	-	-
		307 $R_t$ 1.8 min	0.47	1.47	0.38	1.82	0.46	1.51
		319 $R_t$ 5.8 min	0.45	1.55	0.45	1.55	-	-
<b>Levo-floxacin</b>	3-4	348 $R_t$ 7.2 min	0.53	1.30	0.53	1.30	0.68	1.01
	6-7	310 $R_t$ 5.3 min	0.17	4.16	0.26	2.66	6.47	0.11
		376 $R_t$ 5.2 min	0.15	4.58	0.15	4.55	0.88	0.79
		322 $R_t$ 6.1 min	0.16	4.22	0.16	4.21	1.72	0.40
		338 $R_t$ 1.9 min	0.16	4.47	0.19	3.56	5.14	0.13
	8-9	338 $R_t$ 1.9 min	0.23	3.08	0.76	0.91	1.99	0.35
		338 $R_t$ 4.0 min	0.23	3.04	0.41	1.67	1.80	0.39
<b>Lome-floxacin</b>	3-4	308 $R_t$ 7.3 min	0.59	1.17	0.78	0.89	7.65	0.09
		332 $R_t$ 5.7 min	0.43	1.63	0.43	1.61	1.99	0.35
		348 $R_t$ 3.0 min	0.30	2.31	0.48	1.45	0.48	1.45
	6-7	304 $R_t$ 1.8 min	0.39	1.78	0.18	3.75	3.78	0.18
		322 $R_t$ 2.9 min	0.20	3.38	0.53	1.30	1.96	0.35
	8-9	304 $R_t$ 1.8 min	0.65	1.06	0.17	3.99	0.65	1.06
		322 $R_t$ 2.9 min	0.44	1.56	0.53	1.32	0.52	1.33
		346 $R_t$ 2.1 min	0.23	3.00	0.73	0.96	1.54	0.45
		348 $R_t$ 3.0 min	0.45	1.53	0.45	1.55	1.95	0.35
		350 $R_t$ 3.8 min	0.50	1.38	0.28	2.44	0.49	1.42
		364 $R_t$ 4.3 min	0.14	4.92	0.56	1.24	0.57	1.21
<b>Nor-floxacin</b>	3-4	324 $R_t$ 1.6 min	0.20	3.48	0.60	1.16	0.59	1.17
	6-7	318 $R_t$ 4.0 min	0.15	4.62	5.15	0.13	0.31	2.24
	8-9	336 $R_t$ 8.2 min	0.20	3.44	0.51	1.36	0.52	1.33

## Abkürzungsverzeichnis

AOP	Advanced oxidation process
DAD	Diodenarray-Detector
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EIC	Extracted-ion chromatogram
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
Gl	Gleichung
HPLC	High performance liquid chromatographie
IT	Ion trap
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MS	Massenspektrometer
PC	Principal Component (Hauptkomponente)
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
QSAR	Quantitative structure–activity relationship (Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung)
Q-TOF	Quadrupole time-of-flight mass spectrometer
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
Tab	Tabelle
Vis	visual
VUV	Vakuum UV

## Publikationsliste

### *Teile dieser Dissertation sind in den folgenden Fachzeitschriften publiziert:*

Voigt, M., Jaeger, M. *On the Photodegradation of Azithromycin, Erythromycin and Tylosin and Their Transformation Products – A Kinetic Study*, Sustainable Chemistry and Pharmacy, 5, 131–140 (2017)

Voigt, M., Savelsberg C., Jaeger, M. *Photodegradation of the antibiotic spiramycin studied by HPLC-ESI-qTOF-MS*, Toxicological & Environmental Chemistry, 2017, 99, pp. 624-640

Voigt, M., Gold A., Blaesing, C., Hoelscher, T., Jaeger, M. *Murky Waters*, The Analytical Scientist, 2017, 29, pp. 36-41

### *Weitere Publikationen:*

Legner, R., Friesen, A., Voigt, M., Horst, J., Jaeger, M. *Automation of the picoSpin 80 <sup>1</sup>H NMR benchtop spectrometer for high throughput determination of the research octane number of fuels*, Application Note No. AN52906 Thermo Scientific, 2017

Jaeger, M., Aspers R.L.E.G., Voigt M. *Covariance NMR*. In: Lindon, J.C., Tranter, G.E., and Koppenaal, D.W. (eds.) The Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, 3rd edition vol. 1, pp. 396-400, 2017

Legner, R., Haefner, S., Voigt, M., Horst, J., Eichel, B., Naderwitz, P., Jaeger, M. *Micro Process Analytical Technologies*. G.I.T. Laboratory Journal 2016, 3-4, 31-36; *Mikro - Prozess - Analytik*. GIT - Labor-Fachzeitschrift 2015, 12, pp. 32-34

**Tagungs- und Posterbeiträge**

Voigt, M., Bartels, I., Nickisch-Hartfiel, A., Jaeger, M. *Comparison of UVA and UVC irradiation of FQs and their MICs for sustainable water treatment*, 2<sup>nd</sup> Green and Sustainable Chemistry, Berlin 2017

Voigt, M., Legner, R., Jaeger, M. *Determination of RON using multivariate data analysis and low-field <sup>1</sup>H-NMR @ 45 MHz and 80 MHz*, 51th NMR-DG meeting, Wageningen 2016

Voigt, M., Jaeger, M. *Eliminierung von Metoprolol aus Gewässern mittels Advanced Oxidation Processes (AOPs)*, 2. Mülheimer Wasseranalytisches Seminar, Mülheim 2016

Voigt, M., Jaeger, M. *Antibiotics in Surface Water and their Elimination with VUV/UVC-light*, Analytica Conference, München 2016

Voigt, M., Jaeger, M. *Photodegradation of azithromycin, tylosin and their phototransformation products – A kinetic study using HPLC-QTOF-MS*, Green and Sustainable Chemistry, Berlin 2016

Legner, R., Voigt M., Jaeger, M. *Determination of RON by means of low-field-NMR using PCA and PLS*, 50th NMR-DG meeting, Utrecht 2015

Häfner, S., Legner, R., Voigt, M. *Charakterisierung von Kraftstoffen mittels low-field-NMR- und Raman-Spektroskopie*, Chemcologne, Wuppertal 2015

Noethling, N., Voigt M., Jaeger, M. *Applications of low-field NMR*, 49th NMR-DG meeting, Oss 2014

## **Lebenslauf**

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen meinen herzlichen Dank aussprechen, die fachlich und persönlich zu dem Gelingen meiner Promotion beigetragen haben. Für die hervorragende Zusammenarbeit und Betreuung bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Martin Jäger und Herrn Prof. Dr. Christian Mayer sowie für die Übernahme für den Vorsitz in meinem Disputationsverfahren Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader.

Bei Frau Prof. Dr. Anna Nickisch-Hartfiel möchte ich mich für die ökotoxikologischen Fragestellungen und Ideen bedanken. Einen herzlichen Dank geht an Herrn Joachim Horst, der mir im Labor bei technischen Problemen sehr geholfen hat.

Für das gute Miteinander und die freundschaftliche Atmosphäre bedanke ich mich bei Herrn Robin Legner und den Mitarbeitern von Herrn Prof. Dr. Jürgen Schram sowie bei den Studenten Lara H. Ridene, Andrea Hermsen, Indra Bartels, Christina Savelsberg und Nina Theiss für die Zuarbeiten im Labor.

Herrn Schlichting von der Entsorgungsgesellschaft Krefeld danke ich für die Bereitstellung der Kläranlagenproben. Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei dem Promotionskolleg der Hochschule Niederrhein.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, Großeltern und Freunden für deren Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel

**„Photoinduzierte Degradation pharmazeutisch relevanter Substanzen in Wässern - Kinetische, strukturelle und ökotoxikologische Untersuchungen von Wirkstoffen und deren Abbauprodukten unter Anwendung von Advanced Oxidation Processes“**

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Krefeld, im Mai 2017

---

Melanie Voigt